

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**FUNCIÓN MEDULAR ADRENAL EN PACIENTES  
CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA  
POR DÉFICIT DE 21-HIDROXILASA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Maite Echeverría Fernández**

Directora:

**Amparo Rodríguez Sánchez**

**Madrid, 2010**

ISBN: 978-84-693-7629-4

© Maite Echeverría Fernández, 2010

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA**



**-FUNCIÓN MEDULAR ADRENAL EN PACIENTES  
CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA  
POR DÉFICIT DE 21-HIDROXILASA-**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN  
MEDICINA POR

**MAITE ECHEVERRIA FERNÁNDEZ**

DIRECTORA

**DRA. AMPARO RODRÍGUEZ SÁNCHEZ**

MADRID, 2010

*A **mis padres** y **Amaia**, por todo su cariño y constante dedicación*

*A **Fer**, por su comprensión y apoyo*

*Este trabajo ha sido realizado en la sección de Metabolismo y Desarrollo del Servicio de Pediatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón bajo la dirección de la doctora **Amparo Rodríguez Sánchez**, sin cuyo esfuerzo no habría sido posible.*

*Desearía mostrar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas:*

*A la **Dra. M<sup>o</sup> Dolores Rodríguez Arnao**, por su exigencia y su ayuda constante.*

*A la **Dra. Belén Roldán Martín**, por todas sus enseñanzas y su amistad.*

*A **Virginia Montero** e **Isabel Morillas**, por su colaboración, su ayuda desinteresada y su magnífico trabajo.*

*Al **Dr. Jose María Bellón**, **Dra. Begoña Ezquieta**, **Dra. Elena Dulín**, **Dra. Nieves López** y **Alonsoul Fernández** por facilitar la realización de este trabajo.*

*A la **Dra. Itziar Marsinyach** y el **Dr. Rafael Marañón**, por su capacidad de enseñar y transmitir su entusiasmo por la pediatría.*

*A todas aquellas personas que han colaborado directa o indirectamente en la realización de este trabajo, y sobre todo, “A todos los niños del mundo, nuestro bien más preciado y vulnerable” (Ronald A. Dieckmann).*



# ÍNDICE

# INTRODUCCIÓN

1

## I. GLÁNDULAS SUPRARRENALES

1.-SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDEAS	2
1.1 SÍNTESIS, CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE COLESTEROL	2
1.2 ESTEROIDOGENESIS	3
1.3 REGULACIÓN ENDOCRINA DE LA ESTEROIDOGENESIS	11
1.4 TRANSPORTE PLASMÁTICO	13
2.-SÍNTESIS DE CATECOLAMINAS	14
2.1 BIOSÍNTESIS DE LAS CATECOLAMINAS	15
2.2 ALMACENAMIENTO DE LAS CATECOLAMINAS	17
2.3 TRANSPORTE PLASMÁTICO	18
2.4 REGULACION ENDOCRINA DE LA SECRECIÓN	19
2.5 DEGRADACIÓN DE LAS CATECOLAMINAS	20
3.-GLANDULA SUPRARRENAL COMO UNIDAD	25
3.1 REGULACIÓN PARACRINA DE LA SÍNTESIS DE CATECOLAMINAS Y DE LOS ESTEROIDES SUPRARRENALES	26
3.2. BASES MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES QUE PERMITEN INTERACCIONES PARACRINAS	
CORTICOMEDULARES	36
3.3. IMPLICACIONES CLÍNICAS	40
3.4. INTERACCIÓN INTRAADRENAL DURANTE EL ESTRÉS	41
4.-EVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA ADRENAL	43

## II. HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA

1.-INTRODUCCIÓN	45
2.-PREVALENCIA	45
3.-FORMAS CLÍNICAS	46
3.1. FORMA CLÁSICA	46
3.2. FORMA NO CLÁSICA	49
3. 3. FORMA CRÍPTICA	50
4. 4. PORTADORES	50
4.-DIAGNÓSTICO	51

4.1. DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO	51
4.2 DESPIESTAJE NEONATAL	52
4.3. GENÉTICA MOLECULAR	53
5.-TRATAMIENTO	58
5.1. TRATAMIENTO CON GLUCOCORTICOIDES	58
5.2. TRATAMIENTO CON MINERALCORTICOIDES	59
5.3 TRATAMIENTO DE LA FORMA CLÁSICA	60
5.4 TRATAMIENTO DE LAS FORMAS NO CLÁSICAS	61
5.5 OTROS TRATAMIENTOS	61
5.6 SEGUIMIENTO EN LOS PACIENTES CON HSC	62
5.7 TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO PRENATAL	62
<b>OBJETIVOS</b>	<b>64</b>
<b>PACIENTES Y METODOS</b>	<b>69</b>
I.-SELECCIÓN DE LOS PACIENTES PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO	70
II.-METODOLOGIA	75
III.-TÉCNICAS DE LABORATORIO	85
IV.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO	93
<b>RESULTADOS</b>	<b>94</b>
I.-DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON HSC	95
I.1. ANTECEDENTES FAMILIARES	96
I.2. ANTECEDENTES PERSONALES	96
I.3. DATOS CLÍNICOS AL DIAGNÓSTICO	97
I.4. METODO DE DIAGNÓSTICO	99
I.5. DATOS AUXOLÓGICOS EN EL MOMENTO DEL ESTUDIO	104
I.6. DATOS ANALÍTICOS Y TRATAMIENTO EN EL MOMENTO DEL ESTUDIO	108



I.7. DESCOMPENSACIONES CLINICAS	111
II.-GENÉTICA DE LOS PACIENTES CON HSC	112
III.-NIVELES DE CATECOLAMINAS EN ORINA	116
IV.-RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	118
V.-RELACIÓN FENOTIPO-NIVELES DE ADRENALINA	121
VI.-RELACIÓN GENOTIPO-NIVELES DE ADRENALINA	122
VII.- COMPARACIÓN ENTRE LOS PACIENTES CON FENOTIPO PIERDE SAL EN RELACIÓN A LOS NIVELES DE ADRENALINA	123
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>130</b>
I.-RESULTADOS COMENTADOS	
I.1. FUNCIÓN ADRENOMEDULAR EN PACIENTES CON HSC	131
I.2. IMPLICACIONES DEL DÉFICIT DE ADRENALINA	135
I.3. DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO	139
I.4. GENOTIPO	142
II.-COMPARACIÓN CON ESTUDIOS PREVIOS	145
III.-LIMITACIONES DEL ESTUDIO	149
IV.-CONCLUSIÓN	150
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>153</b>
<b>BASE DE DATOS</b>	<b>157</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>166</b>



## **ABREVIATURAS**

**A:** Adrenalina

**ACTH :** adrenocorticotropa.

**AD:** aldehído deshidrogenasa

**ADH:** alcohol deshidrogenasa

**AMPc:** adenosine-5'-monofosfato ciclico

**ANOVA:** analisis de la varianza

**AR:** aldehído reductasa

**ARP:** actividad de renina plasmática

**CBG:** globulina transportadora de cortisol

**COMT:** catecol-O-metiltransferasa

**CRH:** hormona liberadora de corticotropina

**CYP11A1:** P450 scc o 20,22 colesterol desmolasa

**CYP11B1:** P450c11 o 11 $\beta$ -hidroxilasa

**CYP11B2:** P450c11aldosintetasa o corticosterona metil oxidasa

**CYP17:** P450c17 o 17 $\alpha$  hidroxilasa o 17,20-liasa

**CYP19:** P450 aromatasa

**CYP21A2:** P450c21 o 21-hidroxilasa

**DBH:** dopamina-beta-hidroxilasa

**DE:** desviación estandar

**DHEA:** dehidroepiandrosterona

**DHEA-S:** dehidroepiandrosterona sulfato

**DHT:** dihidrotestosterona

**DHMA:** ácido 3,4-dihidroxi mandélico

**DHPG:** 3,4-dihidroxifenilglicol

**DOCA:** 11-desoxicorticosterona

**DOPAC:** ácido 3,4 dihidroxifenilacético

**DOPAL:** 3,4-dihidroxifenilacetaldehído

**DOPEGAL:** 3,4-dihroxifenilglicolaldehído

**DOPET:** 3,4-dihidroxipeniletanol

**EG:** edad gestacional

**FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos

**HMA:** ácido vanilmandélico

**HMG-CoA:** 3 $\beta$ -hidroxi-3metilglutamil-coenzima A

**HSC:** hiperplasia suprarrenal congénita

**3 $\beta$ -HSD:** 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa

**11 $\beta$ -HSD:** 11 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa

**17 $\beta$ -HSD:** 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa

**HVA:** ácido homovalínico

**MAO:** monoaminooxidasa

**MOPEGAL:** 3-metoxi-4-hidroxifenilglicolaldehído

**NA:** noradrenalina

**NC:** no clásica

**21-OH:** 21-hidroxilasa

**17-OHP:** 17-hidroxiprogesterona

**PS:** pierde sal

**POMC:** proopiomelanocortina

**PNMT:** feniletanolamina-N-metiltransferasa

**StAR:** steroidogenic acute regulatory proteína

**TH:** tirosina hidroxilasa

**TGF:** transforming growth factor

**VIP:** péptido intestinal vasoactivo

**VS:** virilizante simple

# **INTRODUCCIÓN**

# **I.-GLANDULAS SUPRARRENALES**

---

Las glándulas suprarrenales son 2 estructuras piramidales localizadas encima del polo superior de ambos riñones en una posición discretamente medial. Miden aproximadamente 2.5 x 5 cm, con un espesor de 1 cm, y constan de 2 tipos glandulares distintos, la corteza y la médula, envueltos en una cápsula común. El 85-90% de su masa total corresponde a la capa externa o corteza, que se divide en tres zonas: la más externa, denominada glomerulosa, encargada fundamentalmente de la síntesis de mineralocorticoides, una zona intermedia, fasciculada, que secreta glucocorticoides, y la más interna, denominada reticular, que sintetiza sobre todo andrógenos. La médula suprarrenal se encarga de la síntesis de catecolaminas.

## **1. SINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDEAS**

### **1.1 SINTESIS, CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE COLESTEROL**

La corteza suprarrenal sintetiza a partir del colesterol, y mediante una serie de conversiones enzimáticas 3 clases de hormonas: glucocorticoides, mineralcorticoides y andrógenos.

El colesterol destinado a la síntesis de hormonas esteroideas puede tener tres orígenes (1): el procedente de la dieta, el sintetizado de novo a partir de acetato (regulado por la enzima 3 $\beta$ -hidroxi-3metilglutamil.coenzima A (HMG-CoA) reductasa) y los depósitos en los tejidos esteroideogénicos en forma de ésteres de colesterol. La mayoría del colesterol empleado en la síntesis de hormonas esteroideas procede de la dieta, y es transportado en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL). La captación de LDL-colesterol en la glándula suprarrenal es estimulada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La mayor parte de la captación de LDL es mediada por receptores específicos para LDL, que por endocitosis, forman vesículas, que se unen a lisosomas donde los ésteres de colesterol son hidrolizados para liberar el colesterol que servirá de sustrato para la formación de esteroides. El número de receptores para LDL en la superficie celular es regulado de forma negativa por la



captación de LDL-colesterol a través de la endocitosis mediada por los receptores (2). La ACTH aumenta el número de receptores para LDL en la superficie celular, la actividad de colesterol esterasa que libera LDL a partir de los ésteres de colesterol o de gotitas lipídicas almacenadas y, como consecuencia, la cantidad de colesterol libre intracelular (3).

## 1.2 ESTEROIDOGÉNESIS

La mayoría de los enzimas responsables de la esteroidogénesis pertenecen al grupo de proteínas citocrómicas P450 (4). Son oxidasas captadoras de hierro que ocupan un lugar terminal en la cadena de transporte de electrones que media la biotransformación de muchas sustancias de origen endógeno y exógeno. Se denominan así por que tienen un pico de absorbancia a 450 nm cuando se encuentran reducidas con monóxido de carbono y se localizan en la mitocondria o en los microsomas. Las enzimas mitocondriales son P450scc y P450c11, mientras que las microsomales son P450c17 $\alpha$  y P450c21.

La nomenclatura de estas enzimas ha sido modificada tras su clonación molecular tal y como se explica en la tabla 1.

**Tabla 1. Nomenclatura de las enzimas esteroidogénicas.**

<b>Denominación antigua</b>	<b>Denominación actual</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Gen</b>
P450scc	CYP11A1	Colesterol desmolasa	<i>CYP11A1</i> <i>Cr. 15 (q23-q24)</i>
P450c17	CYP17	17 $\alpha$ -hidroxilasa/ 17, 20 liasa	<i>CYP17</i> <i>Cr 10 (q24.3)</i>
P450c21	CYP21A2	21-hidroxilasa	<i>CYP21A2</i> <i>Cr 6 (p21.3)</i>
P450c11	CYP11B1	11 $\beta$ -hidroxilasa	<i>CYP11B1</i> <i>Cr 8 (q24.3)</i>
P450c11aldosintetasa	CYP11B2	Aldosterona sintasa, corticosterona metil oxidasa	<i>CYP11B2</i> <i>Cr 8 (q24.3)</i>

### 1.2.A. Conversión de colesterol a pregnenolona

El colesterol libre es insoluble en el citosol, por lo que es transportado a través del citoplasma hasta mitocondria unida a una proteína transportadora (StarD4) (5). Posteriormente atraviesa la membrana mitocondrial hasta el citoplasma mediante la proteína StAR (steroidogenic acute regulatory protein) (6). Esta proteína es sintetizada muy rápidamente en respuesta a AMPc y tiene una vida media muy corta, permitiendo un rápido control de la esteroidogénesis (7). El defecto de la proteína StAR parece ser la causa de la hiperplasia suprarrenal congénita lipoidea (8). Este gen se localiza en el cromosoma 8. Se ha caracterizado molecularmente un sistema alternativo de transporte a gran escala de ésteres de colesterol al interior de las células esteroidogénicas. Este sistema implica a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y su receptor específico, SR-BI (*scavenger clase BI*) o CLA-1 (de *CD36 and LIMP II analogous-1*). La exposición de células corticosuprarrenales que expresan SR-BI a HDL estimula la síntesis de esteroides suprarrenales en presencia de ACTH (9, 10). A diferencia de la vía LDL, que permite un transporte eficiente pero de baja capacidad, la vía HDL/SR-BI posibilita un transporte a gran escala de ésteres de colesterol, sin necesidad de la endocitosis de la lipoproteína.

La reacción limitante en la biosíntesis de los esteroides es el paso de colesterol a pregnenolona, que se realiza en la mitocondria y está mediada por la enzima **CYP11A1**, también denominada colesterol desmolasa o P450<sub>scc</sub>. La conversión del colesterol a pregnenolona comprende 3 etapas: dos hidroxilaciones en posición 20 y 22 y la escisión de la molécula entre los carbonos 20 y 22, formándose pregnenolona y ácido isocaproico (11, 12).

La síntesis de la proteína CYP11A1 es estimulada por la ACTH: la unión de ACTH a su receptor de membrana aumenta la concentración intracelular de AMPc, que estimula la actividad esterasa que libera el colesterol de los ésteres almacenados, y aumenta las concentraciones de CYP11A1 al aumentar su transcripción (13, 14).

El efecto capital de todas las hormonas capaces de estimular de forma aguda la producción de esteroides, es el de aumentar la de colesterol en pregnenolona. Dicha estimulación no se deba a un aumento de la actividad enzimática del complejo P450<sub>scc</sub>, sino a un transporte aumentado del colesterol desde la membrana externa a la membrana interna de la mitocondria. La pregnenolona es extraída rápidamente de

la mitocondria y es modificada secuencialmente para dar lugar a los distintos tipos de esteroides.

### 1.2.B. Sistemas enzimáticos

En el retículo endoplásmico la pregnenolona puede sufrir 2 conversiones: el paso a 17-OH pregnenolona, reacción catalizada por 17 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP17), y el paso a progesterona, reacción catalizada por la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa B5-B4 (3 $\beta$ -HSD), produciéndose la deshidrogenación del hidroxilo en posición 3 $\beta$  y la isomerización del doble enlace de posición 5-6 a 3-4. a partir de la progesterona y que por sucesivas hidroxilaciones en los carbonos 21, 11 y 18 se forma la aldosterona en la zona glomerular.

En el retículo endoplásmico la proteína **CYP17** tiene una actividad dual, 17 $\alpha$ -hidroxilasa (que media la conversión de pregnenolona a 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona y de progesterona a 17 $\alpha$ -progesterona) y 17,20-liasa (que media la conversión de 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona en DHEA y de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona en  $\Delta$ 4-androstendiona). El hecho de que tenga 2 actividades, implica que la enzima desempeña un papel clave en la orientación de la esteoidogénesis hacia la biosíntesis de glucocorticoides (actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa, pero no liasa) o de esteroides sexuales (presencia de las 2 actividades). En la glándula suprarrenal la enzima CYP17 tiene poca actividad liasa, mientras que esta actividad es muy importante en el testículo, lo que parece deberse a un microclima de los microsomas (15, 16). En las zonas fascicular y reticular existe una mayor actividad 17-hidroxilasa que en la zona glomerular.

La enzima **3 $\beta$ -HSD** cataliza la conversión de pregnenolona a progesterona, de 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y de  $\Delta$ 5-dehidroepiandrosterona (DHEA) a  $\Delta$ 4-androstendiona. Este paso es necesario para la síntesis de glucocorticoides, mineralcorticoides y esteroides sexuales. En la especie humana se han clonado 2 genes, el tipo I y el tipo II y 3 pseudogenes (17-19). Se localizan en la región cromosómica 1p11-p13. El tipo I se expresa en la placenta, la piel, el hígado y la glándula mamaria, y el tipo II en la suprarrenal, el ovario y el testículo.

La enzima **21-hidroxilasa** es también un citocromo microsomal P450, CYP21A2, que se encuentra en el retículo endoplásmico y que utiliza la progesterona y la 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona como sustratos para producir 11-desoxicorticosterona (DOCA) y 11-desoxicortisol respectivamente (20, 21). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que la enzima está presente en las tres zonas de la corteza suprarrenal, con una intensidad más marcada en las zonas glomerulosa y reticular. Sin embargo, la actividad enzimática 21-hidroxilasa no es necesaria para la biosíntesis de esteroides sexuales y por ello, CYP21 no se expresa en las gónadas. La hiperplasia suprarrenal por déficit de 21-hidroxilasa se debe siempre a anomalías del gen CYP21A2.

La última etapa de la biosíntesis de aldosterona en la zona glomerulosa y de cortisol en la zona fasciculada está catalizada por dos enzimas codificadas por diferentes genes (**CYP11B1** y **CYP11B2**), ambos localizados en la región cromosómica 8q22.

En la zona glomerulosa, la proteína CYP11B2 es responsable de tres actividades enzimáticas (22):

- La 11 $\beta$ -hidroxilación de la 11-desoxocorticosterona (DOCA) a corticosterona (compuesto B)
- La 18-hidroxilación que convierte la corticosterona en 18-hidroxicorticosterona
- La 18-oxidación que convierte la 18-hidroxicorticosterona en aldosterona

Este sistema recibe el nombre conjunto de P450c11/aldosterona sintetasa.

En la zona fasciculada, la otra enzima, CYP11B1 cataliza de forma muy activa la transformación de 11-desoxicortisol en cortisol. La actividad 18 hidroxilasa de esta enzima es 10 veces más débil que la CYP11B2. La oxidasa terminal sólo funciona en la zona glomerulosa. En la zona fasciculada se produce alguna 18-hidroxilación de la DOCA y compuesto B por la CYP11B1. El ACTH estimula la transcripción y aumenta la cantidad de proteína CYP11B1 (23-26).

Aunque la CYP11B1 y la CYP11B2 comparten una homología del 95%, las secuencias promotoras 5' difieren y permiten una regulación de las etapas finales de la biosíntesis de los glucocorticoides y mineralcorticoides por la ACTH, y la angiotensina II (entre otros factores, como la elevación de potasio, la depleción de sodio, la angiotensina y la vasopresina) respectivamente (27, 28).

La hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 11 $\beta$ -hidroxilasa se debe a mutaciones de la CYP11B1 y se refleja en un aumento de los niveles plasmáticos del precursor del cortisol (11-desoxicortisol) y de la corticosterona (11-desoxicorticosterona). Como este último esteroide tiene actividad mineralocorticoide, los enfermos presentan hipertensión.

### **1.2.C. Síntesis de cortisol**

La síntesis de cortisol se realiza a partir de la 17 $\alpha$ -hidroxilación de la pregnenolona por la enzima CYP17 en el retículo endoplásmico liso, formándose 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, que pasa a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona por la conversión de su doble enlace 5,6 en un doble enlace en la posición 4,5 por la acción de 3 $\beta$ -HSD, también localizada en el retículo endoplásmico liso. Una vía alternativa menos importante sucede en la zona fasciculada y reticular: la pregnenolona pasa a progesterona, ésta a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, y por acción de la CYP21 a 11-desoxicortisol. Este compuesto es hidroxilado en la mitocondria por 11 $\beta$ -hidroxilación (CYP11B1) hasta formar cortisol. Las zonas fasciculada y reticular también producen 11-desoxicorticosterona, 18-hidroxidesoxicorticosterona y corticosterona, pero en ausencia de CYP11B2 no pueden sintetizar aldosterona.

### **1.2.D. Síntesis de mineralcorticoides**

La síntesis de mineralcorticoides tiene lugar en la zona glomerulosa, donde la falta de expresión de P450c17 dirige la conversión del sustrato pregnenolona en progesterona, por acción de la enzima 3 $\beta$ HSD. La progesterona sintetizada en el retículo endoplásmico sufre una hidroxilación en posición C21 para convertirse en 11-desoxicorticosterona (DOCA) por acción de la enzima CYP21. Finalmente, DOCA es transformada en aldosterona por CYP11B2. La conversión de DOC en aldosterona requiere de una serie concatenada de tres reacciones enzimáticas. En primer lugar, DOC se transforma en corticosterona gracias a la actividad 11 $\beta$ -hidroxilasa de la enzima. A su vez, ésta se convierte en 18OH-corticosterona, por su actividad 18-hidroxilasa, y finalmente pasa a aldosterona mediante la actividad 18-oxidasa. La importancia funcional del complejo P450c11/aldosterona sintetasa queda

de manifiesto por el hecho de que su expresión está regulada de forma precisa por la angiotensina y el potasio, y porque mutaciones inactivantes del gen CYP11B2 producen déficit en la secreción de aldosterona (29).

### **1.2.E. Síntesis de andrógenos**

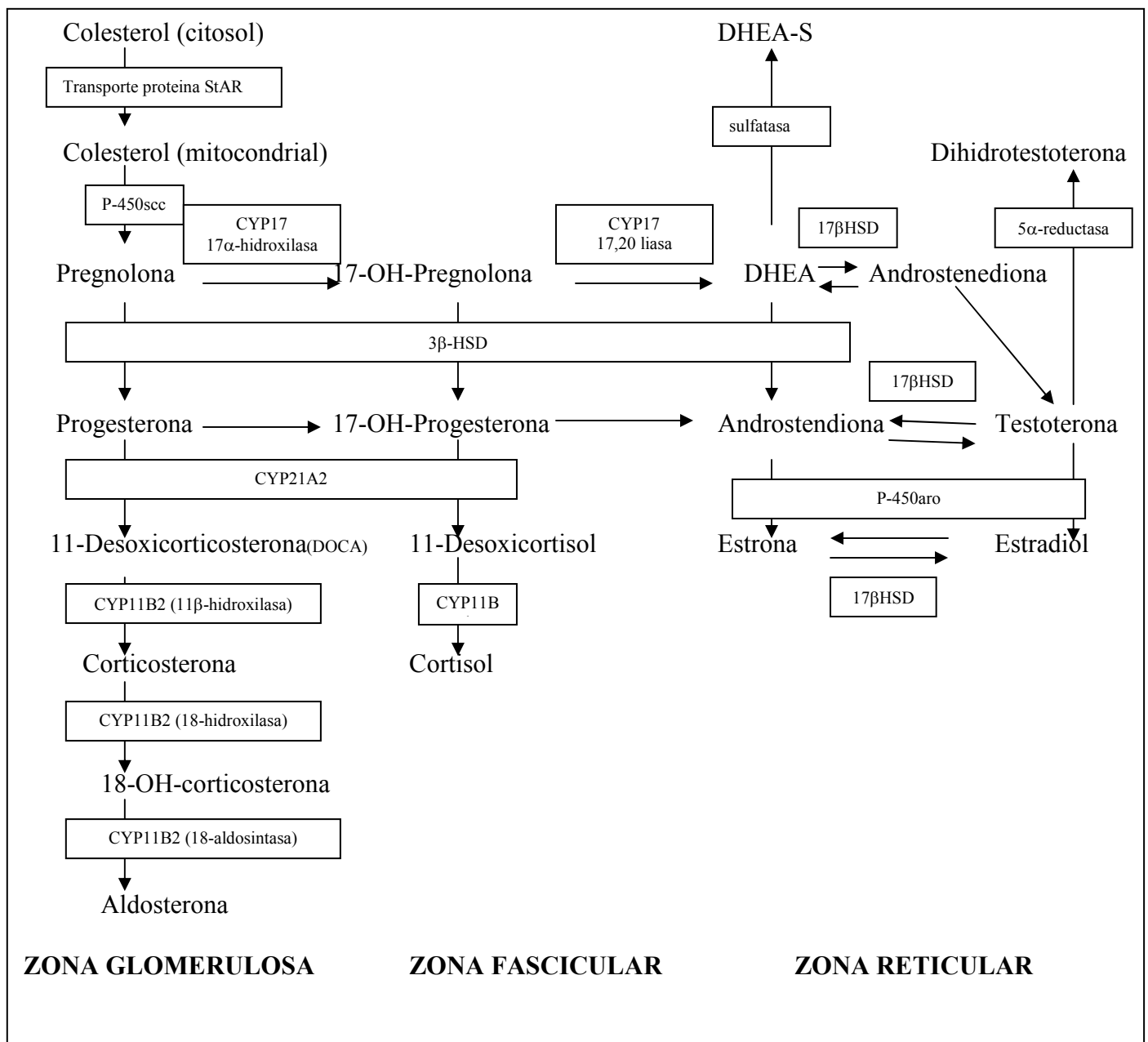
La producción de andrógenos suprarrenales a partir de pregnenolona y progesterona requiere una  $17\alpha$ -hidroxilación previa y por lo tanto no ocurre en la zona glomerulosa, que no expresa CYP17 (30). Los andrógenos cuantitativamente más abundantes en la suprarrenal son DHEA y su conjugado sulfato DHEA-S. Estos dos últimos proceden de la conversión de  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona en C-19 esteroides. Para ello, la  $17,20$  liasa suprime la cadena lateral de dos carbonos que estaba unida a la posición C17 de la  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona y da lugar a DHEA que, por acción de una sulfocinasa reversa, se transforma en DHEA-S. La  $\Delta 4$ -androstendiona es producida a partir de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (a través de  $17,20$  liasa) y en menor cantidad a partir de DHEA (vía  $3\beta$ -HSD). La  $\Delta 4$ -androstendiona puede transformarse en testosterona, aunque la secreción suprarrenal de esta hormona es mínima en condiciones normales. Los andrógenos suprarrenales DHEA, DHEA-S y  $\Delta 4$ -androstendiona tienen escasa actividad androgénica y son transformados a nivel periférico en testosterona y  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), que son andrógenos más potentes por la  $5\alpha$ -reductasa. La DHT es el responsable de la diferenciación de los órganos genitales masculinos y de la próstata. La  $\Delta 4$ -androstendiona es la más rápidamente convertida a testosterona en la periferia por acción de la  $17\beta$ -HSD. La conversión periférica de andrógenos contribuye de forma significativa a las concentraciones circulantes de testosterona en mujeres y no en varones, en los que la síntesis de testosterona se realiza fundamentalmente en el testículo (31).

En la suprarrenal fetal, la esteroidogénesis se produce principalmente en el interior de la zona fetal interna. Debido a una relativa ausencia de  $3\beta$ -HSD y a una alta actividad sulfon-transferasa, los principales productos esteroidogénicos son DHEA y DHEAS, que a continuación son aromatizados por el trofoblasto placentario a estrógenos. Así, la mayor parte de los estrógenos maternos en todo el embarazo son, indirectamente derivados del feto (32, 33).

### **1.2.F. Síntesis de estrógenos**

La etapa final en la biosíntesis de estrógenos es la conversión de los esteroides C19 ( $\Delta$ 4-androstendiona, testosterona y 16-hidroxiandrostendiona) en esteroides C18 correspondientes (estrón, estradiol y estríol). Esta conversión está catalizada por un complejo enzimático que implica una flavoproteína P450reductasa y la P450aro, codificado por CYP19. La aromatización implica tres hidroxilaciones sucesivas del grupo metilo en C19.

Las cantidades de estrón y estradiol secretadas por las glándulas suprarrenales son mínimas en comparación con las secretadas por los ovarios. La conversión periférica de la  $\Delta$ 4-androstendiona y testosterona de origen suprarrenal, en estrón y estradiol respectivamente, ocurre fundamentalmente en el tejido adiposo y en el músculo por acción de CYP19 o aromatasa (34).



**Fig 1: Esquema de la esteroidogénesis suprarrenal.** 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa B5-B4, P450scc: colesterol desmolasa, 17 $\beta$ -HSD:17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, CYP21A2: 21-hidroxilasa, CYP11B2: 11-hidroxilasa, DHEA: dehidroepiandrosterona



### **1.3. REGULACIÓN ENDOCRINA DE LA ESTEROIDOGENESIS**

La secreción de los esteroides corticosuprarrenales está sometida a un preciso sistema de control en el que operan, principalmente, señales endocrinas y otros factores sistémicos, como cambios en la concentración de electrolitos (12, 35). Además, la secreción corticosuprarrenal, fundamentalmente de cortisol, presenta un marcado ritmo circadiano, que está condicionado por el patrón vigilia sueño. Todo ello sugiere la existencia de mecanismos de control muy precisos que permiten ajustar la tasa de secreción de los distintos esteroides suprarrenales a las demandas fisiológicas del organismo.

#### **1.3.1. Regulación de la síntesis de mineralcorticoides**

La aldosterona es el mineralcorticoide más potente, mejorando la retención de sodio y agua y aumentando la tensión arterial. La regulación de la síntesis y liberación de aldosterona está estrechamente relacionada con su acción biológica. Los principales estimuladores fisiológicos de la secreción de aldosterona son la activación del sistema renina-angiotensina y el aumento de los niveles de potasio extracelular que son proporcionales al déficit de sodio en plasma (36). Aunque existen receptores para la angiotensina II en todas las zonas de la corteza suprarrenal, su número es mucho más elevado en la zona glomerular. La formación del complejo angiotensinaII-receptor estimula la fosfolipasa C, enzima de la membrana celular que mediante una cadena de reacciones activa la síntesis de aldosterona (37).

El sistema renina-angiotensina es el principal regulador hormonal de la secreción de aldosterona. La renina producida por las células yuxtglomerulares localizadas en la túnica media de las arteriolas aferentes de los glomérulos renales se integra junto con otros elementos adyacentes (mácula densa y las células de la región mesangial extraglomerular) en una unidad funcional denominada aparato yuxtglomerular. Este sistema es sensible a cambios en la concentración de cloruro sódico en los túbulos distales (detectados por la mácula densa) y la presión de perfusión renal (detectados por las células yuxtglomerulares) (38, 39). Así, tanto la disminución de la concentración de cloruro sódico como la disminución de la presión de perfusión estimulan la secreción de renina. También el estímulo simpático aumenta la secreción de renina. La renina, una vez vertida sobre el torrente

circulatorio, actúa sobre el angiotensinógeno, una  $\alpha$ 2- glicoproteína plasmática producida principalmente en el hígado, induciendo su hidrólisis y la liberación de un fragmento de 10 aminoácidos de su extremo N-terminal, denominado angiotensina-I. Éste es el sustrato de la enzima de conversión de angiotensina, que se encuentra en la superficie de las células endoteliales vasculares del pulmón, para formar angiotensina II (39-41). El factor limitante de la síntesis de angiotensina II es la disponibilidad plasmática de renina. La angiotensina II puede ser hidrolizada por una aminopeptidasa, lo que da lugar a la generación de angiotensina III, un heptapéptido biológicamente activo que, aunque no ejerce acciones presoras, estimula la secreción de aldosterona.

Otro factor esencial en la regulación de la secreción de aldosterona es la concentración de potasio en el medio extracelular. Así, incrementos de los niveles de potasio aumentan significativamente la secreción de aldosterona, mientras que situaciones de hipopotasemia se asocian a una reducción de su síntesis. El mecanismo por el que el potasio extracelular modula la actividad secretora de las células de la glomerulosa implica la inducción de fenómenos de despolarización de membrana que acarrearán la activación de canales de calcio operados por voltaje, con el consiguiente aumento de calcio intracelular. Al igual que la angiotensina II, este estímulo produce la activación de los pasos iniciales y finales de la síntesis de aldosterona (42)

### **1.3.2. Regulación de la síntesis de glucocorticoides y andrógenos suprarrenales**

La ACTH es la principal hormona estimulante de la esteroidogénesis de las zonas más internas de la corteza suprarrenal, es decir, de cortisol y andrógenos suprarrenales. La unión de ACTH a su receptor de membrana produce un aumento de los niveles de AMPc y la activación de la proteína cinasa A, activándose el paso de colesterol a pregnenolona, al ser ésta la reacción limitante, una vez que se ha sintetizado la pregnenolona los pasos restantes pueden realizarse sin la intervención de la ACTH (43). Cuando el estímulo con ACTH se prolonga, aumenta la síntesis de RNAm y de enzimas como la 11, 17 y 21 hidroxilasas y de la  $3\beta$ -HSD (44). La estimulación crónica produce hipertrofia celular, lo que da lugar a un crecimiento

funcional de la suprarrenal que puede llegar a segregar 20 veces mayor cantidad de cortisol que en situación basal (45).

El efecto de la ACTH sobre la zona glomerular es ambivalente: por un lado aumenta su secreción estimulando el paso de colesterol a pregnenolona, efecto que es transitorio, y por otro lado inhibe la conversión de corticosterona en aldosterona, mediante la inhibición de la COMT y estimulando la 17 hidroxilasa (3, 6).

La síntesis de los andrógenos suprarrenales por las zonas fascicular y reticular, al igual de lo que ocurre con el cortisol, depende de la ACTH hipofisaria. La respuesta de las células suprarrenales a la ACTH está modulada por los propios esteroides suprarrenales y por las catecolaminas de la médula. En la zona reticular, existe una menor actividad de 11-hidroxilasa que en las otras dos zonas, lo que hace que sintetice mayor proporción de andrógenos. Entre los factores que inhiben la actividad de la 11-hidroxilasa se encuentran el cortisol, la androstenediona y la adrenalina. Esto hace que la reticular, al encontrarse sometida a mayores concentraciones de estas hormonas que las otras capas, sintetice fundamentalmente DHEA, DHEAS y en menor proporción androstenediona.

## 1.4 TRANSPORTE PLASMÁTICO

Una vez sintetizadas, las hormonas esteroideas no se almacenan en la corteza suprarrenal, sino que abandonan las células y entran en el compartimiento vascular.

**Tabla 2. Tasa de secreción diaria y concentración plasmática de las principales hormonas esteroideas suprarrenales.**

	<b>Tasa de secreción (mg/día)</b>	<b>Concentración plasmática (ng/ml)</b>
<b>Cortisol</b>	8-25	50-200
<b>DHEAS</b>	6-8	1100
<b>Androstendiona</b>	2	1,8
<b>Corticosterona</b>	1-4	3
<b>Desoxicorticosterona</b>	0,6	0,15
<b>Desoxicortisol</b>	0,4	1,5
<b>Aldosterona</b>	0,10-0,15	0,16

En el plasma, entre el 90 y 93% del cortisol circula unido a proteínas y el resto de forma libre. Una pequeña cantidad de cortisol se fija a la albúmina y a otras proteínas plasmáticas, pero la mayor parte circula unida a la transcortina o CBG (*cortisol binding globulin*). Sin embargo, la aldosterona se une débilmente a las proteínas plasmáticas, de modo que el 40% de la aldosterona plasmática se encuentra en forma libre y, por ello, se degrada rápidamente. Esto explica que la semivida del cortisol sea aproximadamente 90 minutos, mientras que la de la aldosterona es de 15 minutos. La CBG tiene una semivida de unos 5 días, y liga el 70% del cortisol plasmático, protegiendo al cortisol de su degradación, sirviendo de reservorio cuando disminuye la fracción libre. Los estrógenos aumentan la producción de transcortina, de modo que en el tercer trimestre del embarazo, la concentración plasmática de la proteína aumenta al doble de los valores normales. Sin embargo, ciertas enfermedades hepáticas, el hipotiroidismo, y la nefrosis contribuyen a disminuir sus niveles. En estos casos el cortisol plasmático total disminuye, pero la cantidad de cortisol libre y la función suprarrenal se mantienen dentro de los límites normales.

La DHEA y la androstendiona se unen a las proteínas plasmáticas, fundamentalmente a la albúmina, a diferencia de la testosterona y los estrógenos que se unen con gran afinidad a la proteína específica que fija los esteroides sexuales, la SHBG (*sexual hormones binding globulin*) (35).

## 2.-SINTESIS DE CATECOLAMINAS

La médula suprarrenal y el sistema nervioso simpático tienen un mismo origen embriológico, la cresta neural, y forman una unidad anatomofuncional conocida como sistema simpatoadrenal.

La célula endocrina de este sistema es la célula cromafín, que es capaz de sintetizar, almacenar y secretar catecolaminas. La mayor parte de estas células se hallan en la médula suprarrenal, aunque existen otras células capaces de secretar catecolaminas en el glomus cardíaco, el glomus yugular, alrededor de las cadenas ganglionares simpáticas, en el órgano de Zuckerkandl, etc.... Estructuras que se deben tener en cuenta ya que pueden ser origen de tumores secretores de catecolaminas (46-48).

El sistema nervioso central ejerce un control directo sobre la liberación de catecolaminas por las terminaciones nerviosas simpáticas de la médula suprarrenal. La producción de las catecolaminas por los diferentes componentes del sistema simpático cromafín será diferente en función de la dotación enzimática que posean. En el ser humano, el 85% de la producción adrenomedular corresponde a la adrenalina. La noradrenalina se sintetiza sobre todo en las neuronas simpáticas periféricas, el sistema nervioso central y en menor proporción, por las células cromafines extrasuprarrenales y en la médula suprarrenal. La dopamina está a elevadas concentraciones en los ganglios basales y en la eminencia media del sistema nervioso central y, a nivel periférico, en las neuronas especializadas de los ganglios simpáticos, en los cuerpos carotídeos y en las células enterocromafines. Además, la dopamina puede formarse en tejidos periféricos no neurales. De hecho, la mayor parte de la dopamina excretada en la orina procede de la decarboxilación de la L-dopa en el túbulo renal (49, 50).

## **2.1 BIOSÍNTESIS DE LAS CATECOLAMINAS**

Químicamente, las catecolaminas son aminas. La estructura en anillo no sólo hace que estos compuestos sean naturalmente fluorescentes sino que también los tornan sensibles a la luz y fácilmente oxidables.

La síntesis de catecolaminas se realiza a partir de la tirosina, que puede sintetizarse en el hígado a partir de la fenilalanina, o provenir de la dieta. La reacción que limita todo el proceso de biosíntesis de catecolaminas es la conversión de tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA), catalizada por la tirosina hidroxilasa (TH) (51).

El siguiente paso es la formación de dopamina, que se realiza en el citosol por decarboxilación de DOPA mediante la acción de la L-aminoácido descarboxilasa (AD). La dopamina es un neurotransmisor importante del sistema nervioso central, y por ello, el producto final de la biosíntesis de catecolaminas en muchas neuronas. La AD puede hallarse a altas concentraciones en tejidos no neurales como en los túbulos renales, en el hígado y en el cerebro.

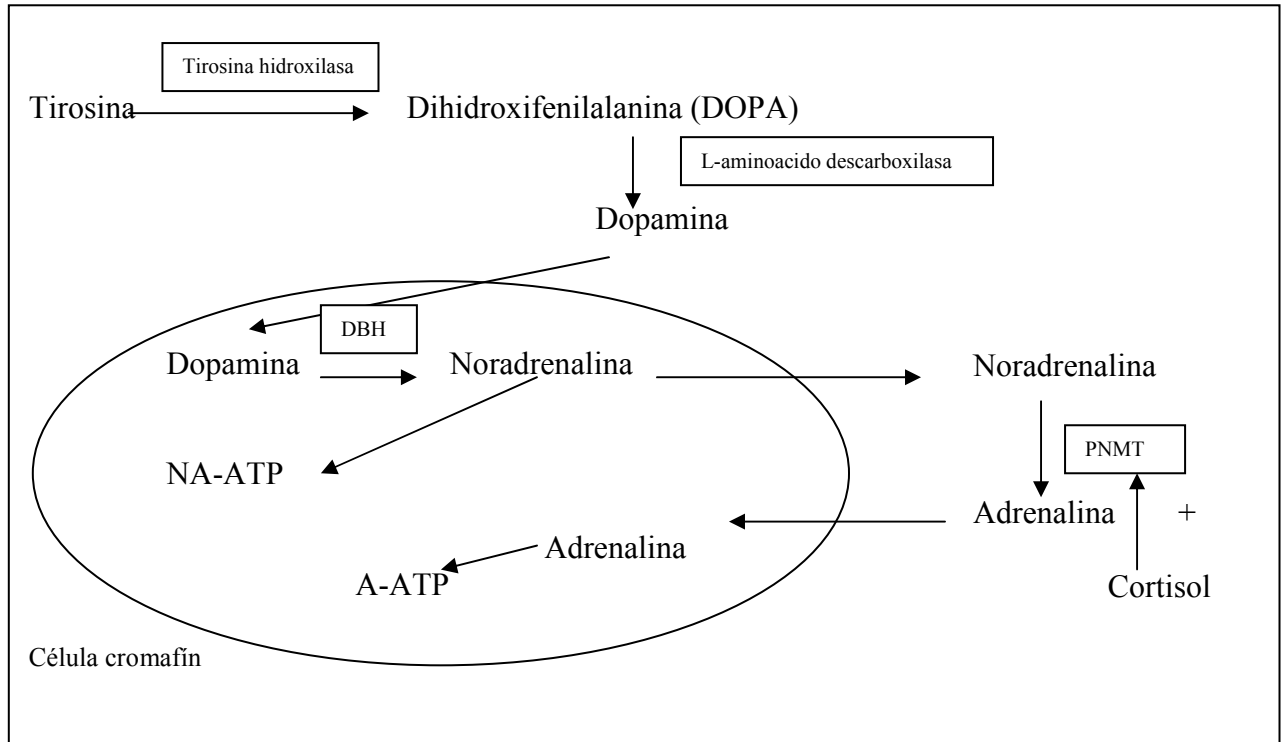
La dopamina entra en los gránulos cromafines y se transforma en noradrenalina por acción de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH), enzima que se expresa exclusivamente en tejidos productores de catecolaminas. La entrada en los

gránulos cromafines podría protegerla de su degradación por la enzima monoaminoxidasa (MAO) ya que ésta tiene mayor afinidad por la dopamina que por la noradrenalina o la adrenalina. La noradrenalina es el producto final en el sistema adrenérgico central periférico, mientras que en la médula puede ser transformada en adrenalina. Para ello, la noradrenalina debe salir de los gránulos al citosol, donde se encuentra la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), que introduce un grupo metilo y, con este paso, se completa la biosíntesis con la formación de adrenalina. PNMT se encuentra en las células cromafines, en el corazón, y también en algunas neuronas del sistema nervioso central que utilizan la adrenalina como neurotransmisor (52-54). Los glucocorticoides son esenciales para el desarrollo de altos niveles de PNMT en la glándula adrenal, pero parece que no son tan importantes para la inducción de PNMT extraadrenal (52).

El cortisol aumenta de manera selectiva el paso de noradrenalina a adrenalina, induciendo la síntesis de PNMT (55), por lo que los glucocorticoides determinan la proporción de adrenalina y noradrenalina sintetizada en las células cromafines. De hecho la biosíntesis de adrenalina depende de la concentración de glucocorticoides en la corteza suprarrenal (56). Esta regulación la hace por dos vías: la primera, controlando la transcripción del gen de PNMT, mediante proteínas como Egr 1 y Sp1, y segundo, regulando la estabilidad de la proteína (57-59). El gen de PNMT se localiza en el brazo largo del cromosoma 17. Además, los glucocorticoides determinan el fenotipo cromafín durante la diferenciación neuronal (60).

La médula suprarrenal, al recibir la sangre de la corteza, está sometida a grandes concentraciones de cortisol por lo que, a diferencia de lo que ocurre en las neuronas simpáticas postganglionares, la adrenalina supone el 80% de las catecolaminas sintetizadas en la médula. De hecho, las células cromafines que se encuentran alrededor de los senos venosos corticomedulares tienen mayor proporción de adrenalina que las células próximas a las arteriolas medulares. Además de por el cortisol, la síntesis de PNMT puede ser inducida por la acetilcolina, a través de la activación de receptores tanto nicotínicos como muscarínicos. La estimulación por la acetilcolina de las neuronas preganglionares simpáticas del nervio esplácnico aumenta la conductancia de las células cromafines al sodio, lo que provoca la despolarización de la membrana celular, apertura de los canales de calcio, aumento del calcio citosólico y liberación de las catecolaminas, del ATP, de la DBH y de todas las demás sustancias contenidas en los gránulos cromafines. La estimulación

simpática aguda de la médula suprarrenal no sólo produce aumento de la liberación de catecolaminas, sino también aumento de su síntesis por activación de la TH y de la DBH. La ACTH también estimula la síntesis de estas 2 últimas enzimas, y aumenta la actividad de PNMT ya que disminuye su degradación (61).



**Fig. 2: Esquema de la biosíntesis de catecolaminas en las células cromafines de la médula suprarrenal.**

**DBH:** dopamina-beta-hidroxilasa; **PNMT:** feniletanolamina-N-metiltransferasa

## 2.2. ALMACENAMIENTO DE LAS CATECOLAMINAS

Una vez sintetizadas, las catecolaminas se almacenan en unos gránulos cromafínicos dentro de unas vesículas que se unen a la membrana de la célula en la médula suprarrenal y en las neuronas postganglionales. Se almacenan junto con ATP, calcio, magnesio y unas proteínas no difusibles (cromograninas) (62) que evitan la oxidación de las catecolaminas por enzimas citosólicas formando complejos que inactivan la degradación enzimática hasta la liberación por exocitosis de los contenidos de las vesículas. La concentración de catecolaminas en los gránulos cromafines es muy alta (aproximadamente 0,5 mol/L).

Además de las catecolaminas, en los gránulos cromafines de la médula suprarrenal se encuentran diversas hormonas y neurotransmisores, como CRH,

péptidos derivados de la POMC, somatostatina, neurotensina, sustancia P, serotonina, GABA, metencefalina y leu-encefalina. Las encefalinas se almacenan y secretan junto con la adrenalina, y aunque su papel fisiológico no se conoce bien, se ha sugerido que podrían ejercer su acción durante el estrés.

### **2.3. TRANSPORTE PLASMÁTICO**

El 50-60% de las catecolaminas en sangre van unidas a la albúmina, a globulinas y a lipoproteínas (63). Los niveles plasmáticos de adrenalina son mayores en la sangre arterial que en la venosa del antebrazo, debida a la extracción que realizan los tejidos, sin embargo, con la noradrenalina ocurre lo contrario, la concentración plasmática es un 30% mayor en la vena que en la arteria, por la producción simpática del propio brazo. A pesar de que los niveles circulantes de adrenalina son menores que los de noradrenalina, la primera desarrolla sus acciones fisiológicas en el rango de concentraciones plasmáticas. Sin embargo, la noradrenalina debe aumentar casi 10 veces su concentración plasmática para tener una acción fisiológica. Los efectos de la noradrenalina se deben a su papel como neurotransmisor y las concentraciones necesarias para que se activen sus receptores se generan localmente en los órganos efectores, por lo que la adrenalina plasmática puede ser considerada como una hormona en el sentido estricto. La noradrenalina plasmática reflejaría la actividad simpática y sus acciones fisiológicas estarían restringidas al órgano donde se ha liberado.

Los niveles plasmáticos de catecolaminas son muy variables, ya que dependen del estado del individuo. En un sujeto normal, en estado de reposo, la concentración plasmática de adrenalina es aproximadamente 50 pg/ml y de noradrenalina 200 pg/ml. La vida media de las catecolaminas en sangre es de 1-2 minutos, lo que hace que sus acciones cesen rápidamente una vez que termina el estímulo que ha desencadenado su secreción. Esto las hace idóneas para los ajustes homeostáticos rápidos y a corto plazo, mientras que las hormonas de la corteza tardan 30 minutos aproximadamente en realizar sus acciones.

Toda la adrenalina plasmática deriva prácticamente de la médula suprarrenal, porque la liberada por el sistema nervioso central no puede atravesar la barrera hematoencefálica. Por el contrario, la noradrenalina plasmática proviene de la difusión desde las sinapsis noradrenérgicas de las neuronas simpáticas



postganglionares, aunque en algunas situaciones como en el ejercicio intenso, o en el infarto agudo de miocardio, la médula suprarrenal contribuye en una parte considerable a los niveles plasmáticos de noradrenalina (64).

## **2.4 REGULACIÓN ENDOCRINA DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS**

La liberación de las catecolaminas tiene lugar por exocitosis, es decir, mediante la ruptura y fusión de la membrana del gránulo cromafín con la membrana celular. En este proceso está implicado el citoesqueleto y cambios en la conformación de las proteínas de fusión. Las neuronas preganglionares simpáticas del nervio esplácnico liberan acetilcolina, que estimula los receptores nicotínicos de las células cromafines. Esto da lugar a un aumento de la conductancia de las células cromafines al sodio, lo que provoca despolarización de la membrana celular, apertura de los canales de calcio citosólico y liberación de las catecolaminas, del ATP, de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa y de todas las demás sustancias contenidas en los gránulos cromafines. El contenido de los gránulos se libera al espacio extracelular y las membranas del gránulo se reciclan, para formar de nuevo un gránulo.

La estimulación simpática aguda de la médula suprarrenal no sólo produce aumento de la liberación de catecolaminas, sino que también aumenta su síntesis mediante la activación de la tirosina hidroxilasa y de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa. La ACTH estimula la síntesis de estas 2 enzimas y el cortisol aumenta selectivamente la de la PNMT.

La actividad de la médula suprarrenal está también regulada por el estímulo de los nervios esplácnicos, de modo que la intensidad de la secreción de las catecolaminas es proporcional a la intensidad del estímulo nervioso, pudiendo aumentar la secreción de catecolaminas hasta cien veces la secreción basal en pocos segundos. La endotelina estimula la liberación de catecolaminas por un mecanismo independiente de la activación colinérgica, aumentando el calcio intracelular (65). La leptina parece que también estimula la síntesis y la secreción de catecolaminas (66). La progesterona inhibe la liberación de catecolaminas mediada por la activación del receptor colinérgico nicotínico, actuando directamente sobre el receptor o sobre los canales del calcio.

En condiciones de reposo, existe una cierta actividad suprarrenomedular, que no desaparece totalmente tras la denervación de la glándula. El papel primordial de la médula suprarrenal es la liberación de catecolaminas a la circulación en las situaciones que ponen en peligro la integridad del organismo. En la exposición al frío o durante el ejercicio físico moderado, la respuesta es inicialmente simpática pero si aumenta la intensidad o duración de cualquiera de ellos, también se activa la médula suprarrenal. Uno de los mayores estímulos que aumentan la secreción adrenomedular es la hipoglucemia (<65-70 mg/dl) (67), pudiendo incrementar hasta 50 veces los niveles de adrenalina en el plasma. Otros estímulos son los traumatismos, insuficiencia circulatoria y en general todas las situaciones de estrés (58, 68).

## **2.5 DEGRADACIÓN DE LAS CATECOLAMINAS**

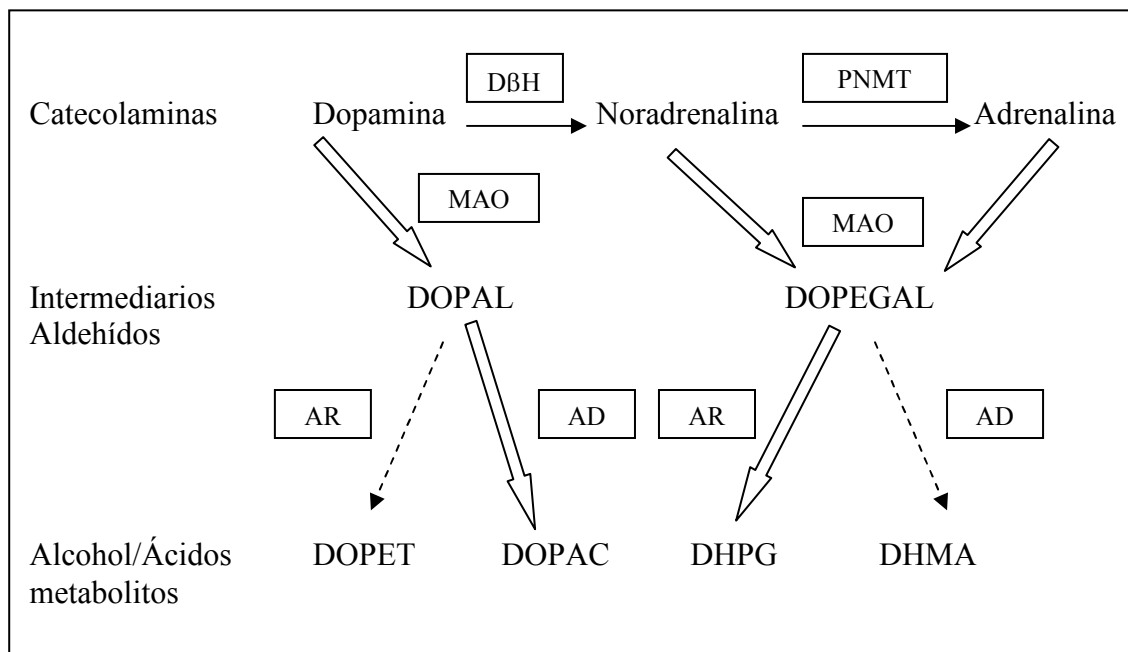
Las enzimas fundamentales que degradan las catecolaminas son la catecolamina-o-metiltransferasa (COMT) y la monoamino oxidasa (MAO) (69).

### **2.5.1 Deaminación de las catecolaminas: (50)**

La MAO cataliza la deaminación de dopamina a 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL) y de adrenalina y noradrenalina a 3,4-dihroxifenilglicolaldehído (DOPEGAL). Posteriormente, la aldehído deshidrogenasa metaboliza DOPAL al ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC), y DOPEGAL en ácido 3,4-dihidroxi mandélico (DHMA), mientras que la aldehído reductasa metaboliza DOPAL a 3,4-dihidroxipeniletanol (DOPET) y DOPEGAL a 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG). Estos metabolitos en forma de alcohol o de ácido son más estables (Fig 3).

Teóricamente, la cantidad de la enzima reductasa o deshidrogenasa es lo que regula que haya más metabolitos en forma de alcohol o ácido, respectivamente. Sin embargo, de cada catecolamina deriva preferentemente un metabolito, y esto depende de la presencia o ausencia del grupo  $\beta$ -hidroxilo (70, 71). La ausencia del grupo  $\beta$ -hidroxilo en la dopamina y en su metabolito deaminado, DOPAL, favorece la oxidación por la aldehído deshidrogenasa, mientras que la presencia del grupo  $\beta$ -hidroxilo en la adrenalina, noradrenalina y su metabolitos deaminados, DOPEGAL,

favorece la reducción por la aldehído reductasa. Esto explica por qué la dopamina se metaboliza en ácido, DOPAC, mientras que la adrenalina y la noradrenalina se metabolizan en alcoholes, DHPG.



**Fig 3: Deaminación de catecolaminas y sus correspondientes intermediarios aldehídos y metabolitos ácidos y alcoholes.**

Las catecolaminas  $\beta$  hidroxiladas, noradrenalina y adrenalina, son metabolizadas preferentemente a alcoholes, mientras que la dopamina, sin grupo  $\beta$ -hidroxilo, es metabolizado preferentemente a ácido.

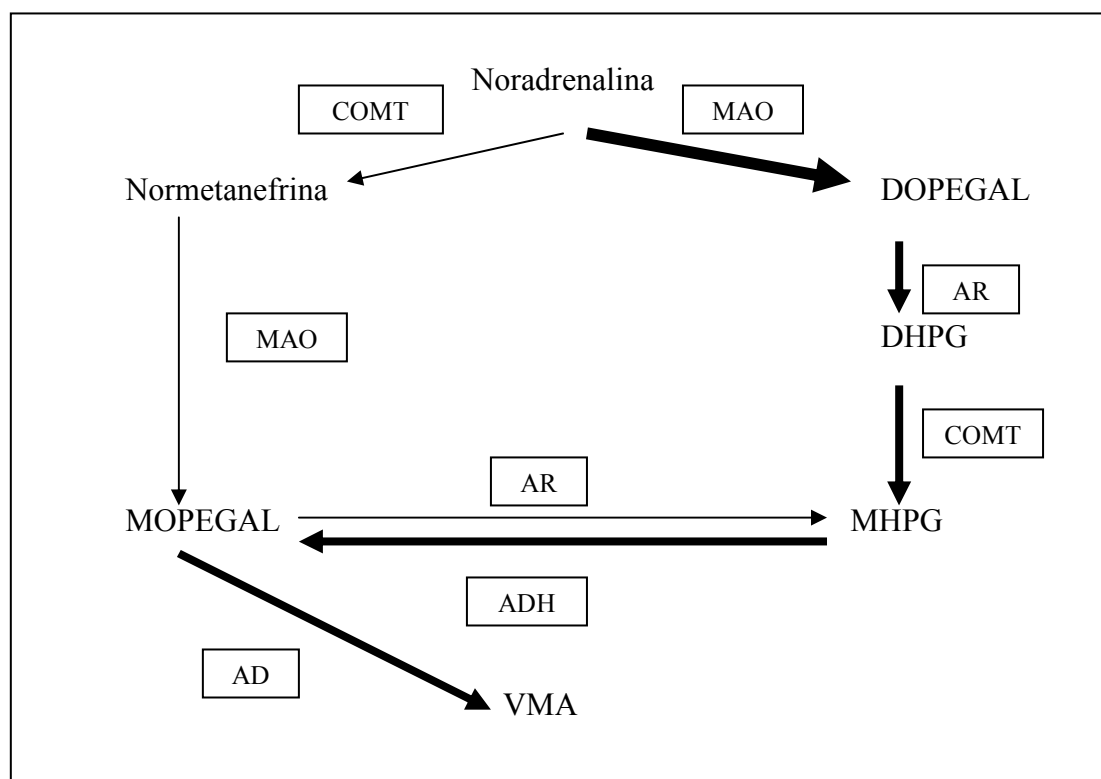
**DOPAL:** 3,4-dihidroxifenilacetaldehído; **DOPEGAL:** 3,4-dihroxifenilglicolaldehído; **DOPAC:** ácido 3,4 dihidroxifenilacético; **DHMA:** ácido 3,4-dihidroxi-mandélico; **DOPET:** 3,4-dihidroxipeniletanol; **DHPG:** 3,4-dihidroxifenilglicol; **D $\beta$ H:** dopamina  $\beta$  hidroxilasa; **PNMT:** feniletanolamina N-metil transferasa; **COMT:** catecol-O-metiltransferasa, **MAO:** monoamino oxidasa; **AR:** aldehído reductasa; **AD:** aldehído deshidrogenasa.

### 2.5.2. Formación de ácido vanilmandélico

En humanos, el producto final más importante en la degradación de la adrenalina y noradrenalina es el ácido vanilmandélico (VMA), que se forma por una O-metilación de la noradrenalina a normetadrenalina y de la adrenalina a metadrenalina, reacción llevada a cabo por COMT, y una posterior oxidación por la MAO a VMA.

El VMA también puede formarse por una O-metilación de DHPG a 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) para dar lugar a 3-metoxi-4-hidroxifenilglicolaldehído

(MOPEGAL), reacción catabolizada por la alcohol deshidrogenasa, y posterior formación de VMA por la aldehído deshidrogenasa (72, 73).



**Fig.4: Formación de noradrenalina en ácido vanilmandélico (VMA).**

**COMT:** catecol-O-metiltransferasa, **MAO:** monoamino oxidasa; **AR:** aldehído reductasa; **AD:** aldehído deshidrogenasa; **ADH:** alcohol deshidrogenasa; **DOPEGAL:** 3,4-dihidroxifenilglicolaldehído; **MOPEGAL:** 3-metoxi-4-hidroxifenilglicolaldehído.

El metabolismo de la dopamina se asemeja al de noradrenalina y adrenalina, con un metabolismo extraneuronal realizado por COMT y MAO, que conduce a la formación de 3-4metoxitiramina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético y finalmente ácido homovalínico (HVA).

La MAO se localiza en la membrana externa de la mitocondria. La MAO regula en metabolismo intracelular de las catecolaminas, inactivando las que se encuentran fuera de los gránulos del citosol. Cuando disminuye su actividad, aumentan los depósitos intracelulares de catecolaminas.

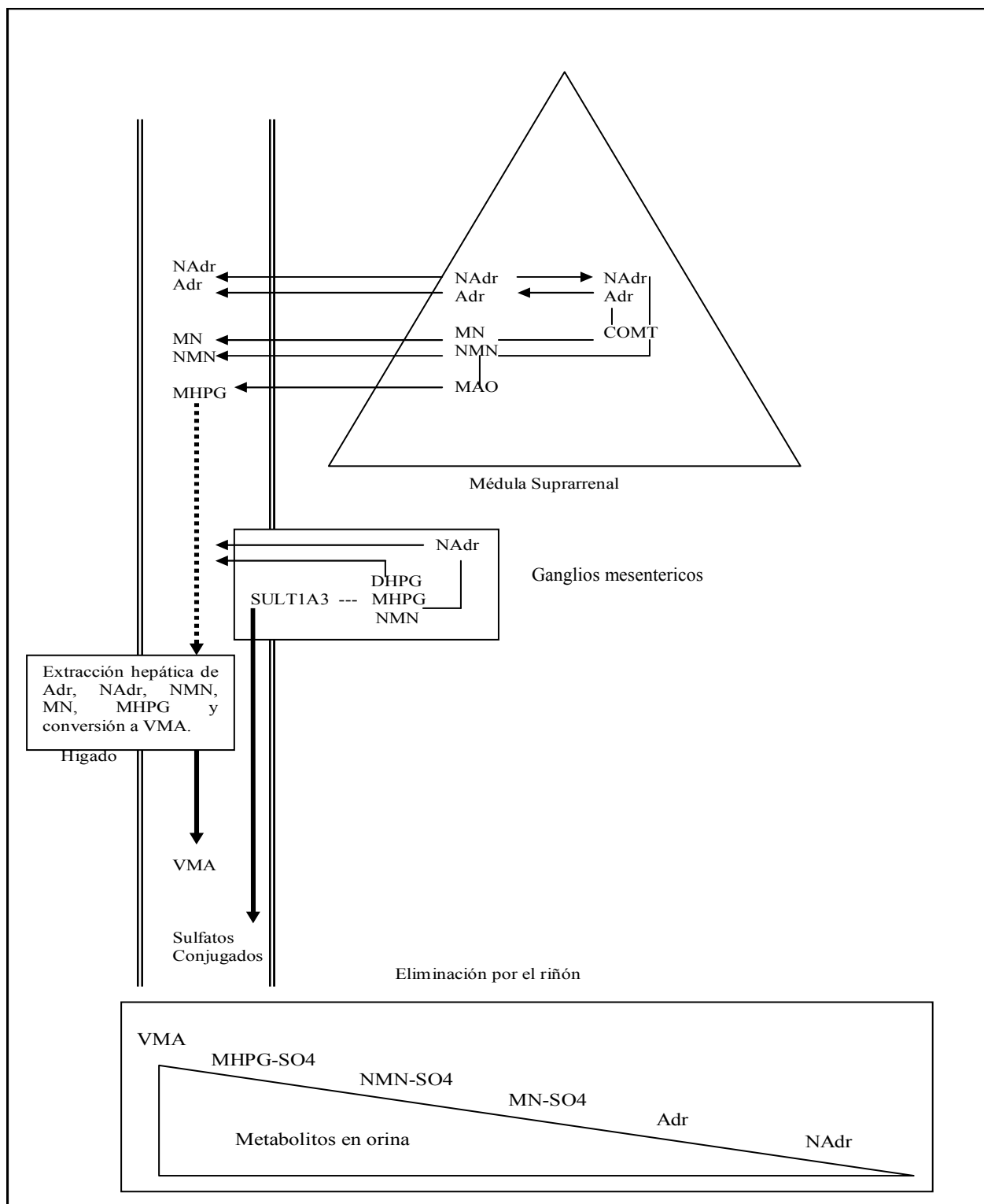
Como las catecolaminas dietarias son extensamente conjugadas antes de llegar a la circulación, los niveles de catecolaminas libres (no conjugadas) en plasma y orina son independientes de las influencias dietarias y reflejan con mayor seguridad la producción endógena (74). En el plasma, casi el 99% de la dopamina y el 60-70% de la noradrenalina y adrenalina circulantes están conjugadas con sulfato y son

excretadas junto con sus derivados o-metilados en orina como conjugados glucurónico y sulfato. En contraste, la catecolamina predominante en orina es dopamina no conjugada, de la cual una sustancial proporción derivada de la síntesis de novo en los túbulos renales a partir del precursor DOPA, ejerciendo de natriurético. Por ello, la excreción urinaria de dopamina refleja una regulación local renal derivada de la DOPA circulante, no de la filtración de la dopamina circulante (49, 75). A diferencia de las catecolaminas y de las metanefrinas, HMMA y HVA no están significativamente conjugadas.

La mayoría de las catecolaminas son metabolizadas en las terminaciones nerviosas (90%). Un pequeño porcentaje (10%) son eliminadas en la orina, la mayoría en su forma conjugada, y menos frecuentemente como metabolitos metilados: normetanefrina, metanefrina y 3 metoxitiramina. La mayor parte de las catecolaminas en orina son en forma de VMA (60%), MHPG, normetadrenalina y metadrenalina sulfato (35%), mientras que una pequeña proporción (2-3%) son liberadas intactas en la orina.

Los productos finales de esta biosíntesis, la adrenalina y noradrenalina, inhiben la actividad de la TH, mientras que la disminución de los depósitos de catecolaminas en los gránulos cromafines activa la TH, aumentando la síntesis de esta enzima.

A diferencia de las células simpáticas que contienen MAO pero no COMT, las células cromafines contienen tanto MAO como COMT. Además, la COMT en las células cromafines está unida a la membrana y de esta forma tiene mucha más afinidad por las catecolaminas que la soluble en el citosol (como sucede en otros tejidos como el hígado o el riñón). Como resultado, la liberación de adrenalina y noradrenalina de los gránulos da lugar a una gran producción de metabolitos metilados, normetanefrina y metanefrina. De hecho, las glándulas adrenales son el órgano que libera más metadrenalina y adrenalina al plasma: el 93% de la metanefrina y entre el 25 y 40% de la normetanefrina circulante derivan de las catecolaminas metabolizadas en las células cromafines (50).



**Fig. 5. Metabolismo de la noradrenalina y adrenalina.**

La mayoría de la noradrenalina es liberada y metabolizada en los nervios simpáticos, incluyendo la producida por los nervios simpáticos de los ganglios mesentéricos. Se representan los principales metabolitos excretados en orina.

**SULT1A3:** sulfotransferasa tipo 1A3; **NAdr:** noradrenalina; **Adr:** adrenalina; **VMA:** ácido vanilmandélico; **MHPG-SO<sub>4</sub>:** 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol sulfato; **NMN-SO<sub>4</sub>:** normetanefrina sulfato; **MN-SO<sub>4</sub>:** metanefrina sulfato; **MN:** metanefrina; **NMN:** normetanefrina.

### 3.-LA SUPRARRENAL COMO UNIDAD

La glándula suprarrenal está formada por dos tejidos endocrinos de diferente origen embriológico: las células de la corteza productoras de esteroides procedentes del mesodermo, y las células cromafines productoras de catecolaminas procedentes de las células de la cresta neural (36).

Convencionalmente, se ha considerado que la corteza y la médula formaban dos unidades endocrinas claramente diferenciadas y separadas. Sin embargo, se ha visto que estos tejidos no están solamente morfológicamente relacionados, sino que interactúan entre sí, regulando sus respectivas funciones. Es decir, las células cromafines regulan la liberación de las hormonas esteroideas, y los corticoesteroides inducen la síntesis de catecolaminas en la médula. Consecuentemente, alteraciones en la corteza suprarrenal pueden afectar a la función de las células cromafines y viceversa (36).

Este control integrado involucra interacciones córtico-medulares, el aporte vascular y neural, el sistema inmune, factores de crecimiento, el sistema renina-angiotensina intraglandular, y el sistema CRH-ACTH. Estos sistemas influyen unos en otros y forman complejos circuitos de regulación intraadrenales.

Como resultado de muchos estudios, ahora sabemos que varios mecanismos reguladores están localizados en la propia suprarrenal, y que varios componentes de la glándula contribuyen a estas funciones. La suprarrenal produce una amplia variedad de hormonas, neuropéptidos, neurotransmisores y citoquinas, y la localización de estos sistemas tiene gran importancia funcional. Las células de la glándula suprarrenal se comunican unas con otras y se adaptan a la función de la glándula en diferentes situaciones. Estas interacciones son especialmente importantes para el ajuste fino de la glándula y para la adaptación a situaciones de estrés o de enfermedad.

### 3.1 REGULACIÓN PARACRINA DE LA SÍNTESIS DE CATECOLAMINAS Y DE LOS ESTEROIDES SUPRARRENALES

#### 3.1.1. Regulación de la función medular por la corteza

La influencia de las células corticales en la médula suprarrenal puede constatarse ya durante la embriogénesis. Las células cromafines procedentes de la cresta neural migran a la glándula suprarrenal y posteriormente se diferencian en células cromafines productoras de catecolaminas, otros neuropéptidos y neurotransmisores bajo la influencia de los esteroides de la corteza suprarrenal (76, 77).

Por primera vez en 1965 Wurtman y Axelrod mostraron que los **glucocorticoides** regulaban la diferenciación de las células cromafines, la síntesis de catecolaminas y el paso de noradrenalina a adrenalina *in vitro* (78). Estudios más recientes han confirmado la influencia de los esteroides en la expresión de enzimas que participan en la síntesis de catecolaminas, como la tirosina hidroxilasa (79, 80), dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (81) y la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), que cataboliza el paso de noradrenalina a adrenalina, favoreciendo además la liberación de catecolaminas a la circulación. La expresión de PNMT, y consecuentemente la síntesis de adrenalina por las células cromafines, depende de la existencia de altas concentraciones de glucocorticoides intraadrenales (78), que son liberados desde la corteza a la médula por el sistema portal intra-adrenal. Esta regulación se realiza por dos vías: por un lado, controlando los genes que expresan PNMT, y por otro, regulando la estabilidad de la proteína que se forma (57), permitiendo controlar la actividad de PNMT (55, 82, 83).

Cuando se cultivan *in vitro* células cromafines, progresivamente cambian su fenotipo a células nerviosas, disminuyendo la producción de adrenalina y noradrenalina y aumentando la formación de neuritas. Si se añaden glucocorticoides al medio de cultivo, se inhibe la formación de neuritas, y cambian nuevamente el fenotipo a células nerviosas productoras de adrenalina y noradrenalina (84-86). Aunque los glucocorticoides son los factores más importantes que determinan el “fenotipo” de la célula cromafín, existen otros mecanismos que también regulan la expresión de PNMT, como son la hipoxia y otras proteínas como Egr1 (early growth response 1) y Sp1 (58, 60).



El andrógeno sintetizado en la corteza suprarrenal, **DHEA**, también tiene control en la síntesis de catecolaminas. DHEA es la hormona sintetizada mayoritariamente durante el primordio suprarrenal fetal, cuando las células cromafines van adquiriendo las características de células neuroendocrinas productoras de catecolaminas. Se ha identificado a DHEA como un regulador de las células del sistema neuronal, desarrollando un importante papel tanto en el crecimiento de la glándula, como en el proceso de diferenciación de las células cromafines (87-90).

DHEA inhibe los factores de crecimiento que estimulan la proliferación de las células cromafines e induce la expresión de la tiroxina hidroxilasa, enzima limitante de la biosíntesis de catecolaminas (90), estimulando la liberación de catecolaminas (91-94). Durante la pubertad existe una relación inversa entre los niveles de adrenalina sanguíneos y los niveles de DHEA-S, lo que sugiere que existen interacciones entre la producción de andrógenos suprarrenales y de catecolaminas (95).

Las células indiferenciadas cromafines poseen receptores de mineralcorticoides. La **aldosterona** estimula la síntesis de catecolaminas activando la enzima limitante de su síntesis, la tirosina hidroxilasa, de forma que si se bloquean los receptores de mineralcorticoides con eplerenona (antagonista de la aldosterona), disminuye la síntesis de RNAm de la tirosina hidroxilasa y la producción de dopamina (79, 96).

También son necesarios otros neuropéptidos y factores de crecimiento para mantener intacta la célula cromafín, como son cromograninas, neuropéptidos, dopamina y 3-metoxitiramina.

### **3.1.2. Regulación paracrina de la esteroidogénesis**

La ACTH y la angiotensina II son los principales estímulos para la esteroidogénesis de la corteza suprarrenal. Sin embargo, diferentes estudios han mostrado la importancia de factores paracrinós en la regulación de la función adrenocortical, debido fundamentalmente a dos tipos de pruebas: la presencia incluso en mamíferos de una estrecha relación entre grupos de células adrenocorticales y medulares, con grandes superficies de contacto, que favorece la interacción paracrina entre ambas poblaciones, y la demostración de divergencias detectables entre los

niveles circulantes de los principales reguladores sistémicos y las tasas de secreción corticosuprarrenal (97, 98).

#### **A. Factores producidos por la médula adrenal**

Las células cromafines de la médula suprarrenal producen catecolaminas y una gran variedad de neuropéptidos, incluido CRH (*corticotropin-releasing hormone*), encefalinas, péptido generador de calcitonina, neuropéptido Y, neurotensina, galanina, sustancia P, arginina, vasopresina, oxitocina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), somatostatina, PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*), y péptidos derivados de la POMC (*proopiomelanocortin*) (99, 100).

Cuando se cultivan conjuntamente células cromafines y células de la corteza suprarrenal, la secreción de cortisol aumenta hasta 10 veces la secreción basal. Este efecto es independiente del contacto celular, ya que los niveles de cortisol se elevan a los mismos valores cuando los dos tipos celulares están en contacto directo o están separados por una membrana (101), lo que pone de manifiesto interacciones paracrinas entre las células de la corteza y la médula (101-103).

Estudios *in vitro* han demostrado que las catecolaminas activan la transcripción de genes esteroideogénicos y la síntesis de hormonas de la corteza (104-106). En la glándula humana, diferentes neuropéptidos producidos por las células cromafines como VIP, PACAP, PNA (péptido natriurético atrial) y la vasopresina parecen tener más efecto en la esteroideogénesis (107).

Las catecolaminas también influyen en la esteroideogénesis a nivel molecular, aumentando la transcripción de RNAm de 4 enzimas implicadas en la esteroideogénesis: CYP11A1, CYP17, CYP21A2 y CYP11B (105, 108).

La inervación simpática adrenal es necesaria para mantener la variación diurna de la esteroideogénesis. La estimulación del nervio esplácnico produce un aumento en la secreción de cortisol, pero sólo cuando existen niveles suficientes de ACTH circulante (109, 110). Es decir, la inervación esplácnica puede facilitar la secreción de cortisol inducida por ACTH. La denervación esplácnica disminuye la sensibilidad a la ACTH, tanto endógena como exógena, disminuyendo a su vez la secreción nocturna de cortisol hasta un 50%. Sin embargo, en ausencia de perfusión suprarrenal, la esteroideogénesis puede llevarse a cabo a través del sistema simpático-

adrenal, probablemente mediado por la estimulación paracrina de las células cromafines (111-113).

#### □ **Adrenalina y noradrenalina:**

La adrenalina y noradrenalina pueden ser liberadas tanto de las terminaciones nerviosas en la corteza adrenal como de los gránulos de las células cromafines.

Se ha visto en varios modelos de animales la influencia de las catecolaminas en la **esteroidogénesis** (109, 114, 115). La adrenalina y noradrenalina aumentan la secreción de aldosterona y la actividad de la renina, y probablemente también la secreción de glucocorticoides, siendo este estímulo independiente de ACTH y de angiotensina II (116, 117).

Las células de la corteza suprarrenal poseen receptores  $\alpha$  y  $\beta$  para la adrenalina y noradrenalina, aunque parece que los receptores  $\beta$  tienen más importancia.

1.- Receptores  $\beta$ : tanto las catecolaminas como sus  $\beta$ -agonistas (isoprenalina y dobutamina) estimulan *in vitro* en la zona glomerulosa la secreción de aldosterona y este efecto puede ser bloqueado por los  $\beta$ -antagonistas, como el propranolol y L-alprenolol. (118). Se ha observado un efecto similar en la secreción de glucocorticoides por la zona fasciculada y reticular: la adrenalina estimula la liberación de androstendiona en la zona reticular, siendo este efecto dosis dependiente (119). El efecto de la adrenalina sobre la androstendiona es inhibido por  $\beta$ -bloqueantes como propranolol, mientras que los  $\alpha$ -bloqueantes como la fentolamina no tienen este efecto (106). El propranolol bloquea la acción tanto de la adrenalina como de la noradrenalina (101, 120)

2.-Receptores  $\alpha$ : parece que inhiben la secreción de aldosterona en la zona glomerular, sugiriendo que los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  mantienen funciones opuestas en la regulación de la función cortical (121). Otros estudios han mostrado que la adrenalina aumenta la secreción de cortisol y este efecto puede ser bloqueado por los  $\alpha$ -antagonistas pero no por  $\beta$ -antagonistas (102).

#### ❑ **Otros neuropéptidos:**

Además de la adrenalina y noradrenalina, existen otros neurotransmisores que se sintetizan en la médula adrenal e influyen en la actividad de la corteza, tanto regulando la esteroidogénesis, como modulando otras funciones intraadrenales.

Muchos de estos péptidos influyen en la producción de esteroides, sobre todo activando la función adrenocortical. Por ejemplo, el péptido vasoactivo intestinal, galanina, vasopresina, oxitocina, neuropeptido Y, sustancia P, neuromedina N, serotonina e interleukina 1, pueden aumentar la síntesis de corticosteroides (122, 123). Mientras que otros péptidos como el péptido natriurético atrial, dinorfina, somatostatina, encefalinas, el propranolol y las TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) lo inhiben.

La dopamina ejerce un importante control sobre la secreción de aldosterona en la zona glomerulosa, donde existen abundantes receptores D1 y D2 para la dopamina. Parece que estos dos receptores tienen efectos opuestos, ya que la activación del subtipo D1 produce un aumento de la adenil-ciclase y de la aldosterona, mientras que la activación del subtipo D2 tiene el efecto contrario (118).

La serotonina estimula directamente la secreción de aldosterona y de cortisol mediante la activación de la vía fosfolipasa C y la adenilato ciclase (123, 124).

La indometacina inhibe parcialmente la esteroidogénesis, lo que refleja el efecto estimulador de las prostaglandinas. Se ha visto que diferentes citoquinas pueden estimular la esteroidogénesis mediante la liberación local de prostaglandinas. La interleukina 1 es la única citosina que se produce en las células cromafines y estimula la esteroidogénesis cuando se cultivan con células corticales en bovinos. Esta estimulación está mediada por la liberación de prostaglandinas producidas por fibroblastos, leucocitos y células endoteliales (125).

**Tabla 3. Efecto de los productos de las células cromafines en la esteroidogénesis en mamíferos.**  
Adaptado de ref. (98)

Producto de la célula cromafín	Efecto en la esteroidogénesis
Adrenalina	↑Aldosterona ↑Cortisol ↑Androstendiona
Noradrenalina	↑Aldosterona ↑Cortisol
Dopamina	↓Aldosterona (glándulas adrenales de ratas) ↑Aldosterona (células glomerulares cultivadas de ratas) ↓Aldosterona (células adrenales cultivadas de bovinos)
Acetilcolina	↑Aldosterona ↑Cortisol
Serotonina	↑Aldosterona ↑Cortisol
VIP	↑Aldosterona ↑Cortisol ↑Androstendiona
Galanina	↑Aldosterona ↑Cortisol
Vasopresina	↑Aldosterona ↑Corticosterona
Oxitocina	↑Aldosterona ↑Cortisol
Neuropéptido Y	↑Aldosterona ↑Corticosterona (Glándula adrenal) ↓Corticosterona (Células adrenales aisladas)
Polipéptido YY	↓Aldosterona
Sustancia P	↑Aldosterona (células glomerulares cultivadas de ratas) ↓Aldosterona (células adrenales cultivadas de bovinos) ↑Cortisol
PACAP	↑Aldosterona ↑Cortisol No efecto en la aldosterona ni cortisol en células adrenales humanas cultivadas
ANP ( <i>atrial natriuretic peptide</i> )	↓Aldosterona ↓DHEA ↓Cortisol ↓Androstendiona ↓Progesterona ↓Deoxicorticosterona
Somatostatina	↓Angiotensina II estimulada por aldosterona
Encefalinas	↑Aldosterona (glándulas adrenales)

	↓Aldosterona (células adrenales cultivadas de ratas y bovinos) ↑Cortisol
CGRP ( <i>calcitonin gene-related peptide</i> )	↑Cortisol ↑Aldosterona

## B. Sistema CRH/ACTH intraadrenal

Existe un sistema CRH/ACTH en la glándula suprarrenal, más concretamente intramedular, y está involucrado principalmente en el mantenimiento, estimulación de la secreción y crecimiento de las zonas internas de la corteza suprarrenal.

La principal acción de CRH intraadrenal es estimular la liberación paracrina/autocrina de ACTH por las células cromafines (98).

### □ CRH extrapituitaria:

En 1981 se aisló por primera vez CRH ovino (126, 127). Posteriormente, en 1984 De Souza et al. descubrieron el efecto extrapituitario de CRH en la esteroidogénesis suprarrenal, independientemente del eje HHS (128).

En animales hipofisectomizados, altas dosis de CRH tienen un efecto trófico en la corteza suprarrenal, estimulan la esteroidogénesis y aumentan la sensibilidad de la glándula suprarrenal a la ACTH. (128-131).

Estudios de inmunohistoquímica han demostrado que CRH puede localizarse formando grupos en la corteza, en la médula, pero sobre todo en la unión córtico-medular (132-134). El contenido de CRH en la médula varía de unas especies a otras, siendo en los humanos de 3-4 pmol/gr (135).

El mecanismo por el que CRH influye en la esteroidogénesis parece que es más indirecto que directo. Por un lado, CRH puede actuar junto con ACTH directamente a través de los vasos intraadrenales, y por otro, la médula puede responder a CRH mediante la liberación de secretagogos que estimulen la función cortical (98).

Experimentos en los que se ha neutralizado el efecto de CRH han evidenciado la influencia de CRH extrapituitaria en la corteza suprarrenal, produciendo una disminución de cortisol en plasma de hasta el 40-60% sin una

disminución de ACTH concomitante (136), y una disminución de la sensibilidad de la glándula a la ACTH (130).

Los niveles plasmáticos de CRH son probablemente demasiado bajos como para estimular la liberación de ACTH en la médula suprarrenal, por lo que parece que lo que estimula la liberación de ACTH es un péptido *CRH-like* (135, 137), que se libera en respuesta a estímulos fisiológicos como hemorragia, estimulación del nervio esplácnico, vasopresina, neurotensina, neuropéptidos K, IL- $\beta$ , etc (132, 138).

También existen receptores de CRH en la glándula suprarrenal de primates, que están localizados exclusivamente en la medula, no en la corteza. Estos receptores están acoplados a la adenilato ciclasa y estimulan la secreción de catecolaminas y met-enkefalinas (139-141).

#### □ **ACTH intraadrenal**

La hipótesis de que la producción local (intraadrenal) de ACTH puede mediar la respuesta de CRH en la esteroidogénesis suprarrenal independientemente de la ACTH pituitaria es porque “*in vitro*” el efecto secretagogo de CRH es bloqueado por CIP (*corticotropin inhibiting peptide*), un inhibidor de ACTH (142-144).

Estudios de radioinmunoensayo (RIA) han demostrado la presencia de ACTH en la médula suprarrenal y su contenido de hasta 50 pmol/g en humanos (107, 137, 144, 145).

Se ha postulado también la presencia de ACTH intraadrenal porque si se estimula el nervio esplácnico a ratas hipofisectomizadas, se libera ACTH desde la médula al afluyente venoso (107, 135). Además, pacientes con déficit de ACTH que reciben terapia con ACTH, la administración posterior de CRH produce un aumento significativo del cortisol plasmático precedido por un aumento en plasma de ACTH, como si CRH pudiera estimular la liberación de cortisol independientemente de la ACTH pituitaria (146).

Todos estos datos sugieren que la médula adrenal produce ACTH extrapituitaria y ésta puede ser estimulada por CRH (98). La regulación del sistema CRH/ACTH adrenal se realiza por mecanismos de feedback a través de los productos finales de los glucocorticoides y ACTH. Algunos neuropéptidos como PACAP y neuromedina pueden estimular la secreción de esteroides de la corteza suprarrenal activando el sistema CRH/ACTH intraadrenal (147-149).

### C. Sistema renina-angiotensina intraadrenal

Existe un sistema renina-angiotensina en la corteza suprarrenal, sobre todo en la zona glomerulosa. Este sistema produce angiotensina II. Actúa de forma paracrina/autocrina regulando la formación de aldosterona y la secreción de la misma por la zona glomerulosa, y responde a las demandas fisiológicas de la circulación (98).

Se han identificado en el tejido suprarrenal genes transcriptores de prorenina, angiotensinógeno y enzima convertidora de angiotensina, así como proteínas para las que codifican, tanto en su forma activa (renina, angiotensina II), como en su forma inactiva.

Esta regulación intra-adrenal de la aldosterona puede tener una importante implicación clínica durante el estrés, ya que la activación del sistema renina-angiotensina puede depender no sólo del volumen circulante y la presión arterial, sino de la activación simpática (150).

### D. Citoquinas

Las citoquinas producidas por las células inmunes que regularmente infiltran la glándula adrenal o las propias células adrenales pueden influenciar directamente en la función adrenocortical (151).

IL-1, IL-2 e IL-6 estimulan la esteroidogénesis. TNF- $\alpha$ , interferón  $\gamma$  ejercen una función reguladora del crecimiento de la glándula adrenal. El sistema inmune y el sistema endocrino tienen un papel crucial en la adaptación a cambios de homeostasis, tanto durante el estrés como en la enfermedad.

**Tabla 4. Efecto de citoquinas en las células adrenales. Adaptado de ref. (98)**

Citoquinas	Efecto
IL-1	↑ Cortisol ↑ Adrenalina ↓ Angiotensina II
IL-2	↑ Cortisol
IL-6	↑ Cortisol ↑ Aldosterona
TNF $\alpha$	↑ Cortisol ↓ Angiotensina II
IFN $\alpha$	↑ Cortisol



## **E. Factores de crecimiento**

El desarrollo, la diferenciación y el mantenimiento de la glándula adrenal parece estar mediada, además de por ACTH y angiotensina II, por la producción local de factores de crecimiento como IGFs, TGF $\beta$  (*transforming growth factor*) y  $\beta$ FGF (*fibroblastic growth factor*).

Estos péptidos ejercen una gran variedad de acciones, tanto estimuladoras como inhibitoras del crecimiento, de la diferenciación y controlan las diferentes funciones de la glándula. Además pueden regular las funciones de otros factores sistémicos, como ACTH, y contribuir en la secreción de hormonas esteroideas (98, 152).

## **F. Inervación adrenal**

Los neurotransmisores procedentes de la innervación adrenal tienen gran variedad de acciones, desde efectos directos en el crecimiento y esteroidogénesis, a la modulación de las acciones de otros estímulos hormonales en la corteza adrenal. La inervación adrenocortical tiene un papel importante en la regulación fina de la corteza.

El neuropéptido mas estudiado ha sido VIP. Existe un sistema neural VIP-érgico intrínseco adrenal, cuyos cuerpos celulares están localizados en la médula y las fibras varicosas en la zona glomerulosa. Estos hallazgos se han confirmado con la existencia de otros sistemas nerviosos peptidérgicos intrínsecos, como sustancia P y neuropéptido Y (153).

La estimulación del nervio esplácnico produce la liberación de varios neuropéptidos al afluyente venoso, sin embargo no está claro hasta dónde el nervio esplácnico puede regular la innervación cortical en comparación con la médula. Los neurotransmisores que se encuentran en las fibras nerviosas de la corteza son los mismos que se encuentran en las células cromafines de la médula. Es difícil distinguir entre los nervios de la corteza intrínsecos y extrínsecos, y por ello, es difícil saber cuánto influye el nervio esplácnico en la inervación de la corteza.

Sin embargo, lo que se sabe es que el nervio esplácnico regula la sensibilidad de la corteza a la estimulación de ACTH, ya que seccionando el nervio esplácnico,

disminuye la respuesta a ACTH, siendo necesario la integridad de este sistema para mantener la variación diurna en la esteroidogénesis (154, 155).

### G. Sistema vascular

La regulación del flujo adrenal es compleja y probablemente involucre mediadores locales y humorales. Existe una estrecha relación entre los eventos vasculares y la secreción esteroidea, que puede estar mediado por el endotelio vascular de forma paracrina.

Los efectos de los productos del endotelio vascular en la producción de esteroides son diferentes de unas sustancias a otras. Así, la endotelina-1 estimula la secreción de glucocorticoides (156), aumenta la secreción de aldosterona estimulada por ACTH y la de angiotensina II (37, 157). La adrenomedulina, que se produce tanto en la zona glomerulosa como en las células cromafines, aumenta la secreción de aldosterona y disminuye la de angiotensina (158). El óxido nítrico también tiene efectos en la secreción esteroidea. La secreción basal de esteroides es menor en ausencia de NO sintetasa que en presencia de ella (159)

**Tabla 5. Efecto de los productos endoteliales en la esteroidogénesis. Adaptado de ref. (98)**

Sustancia	Efecto en la esteroidogénesis
Endotelina	<p>↑Aldosterona y cortisol (células adrenales)</p> <p>↑Aldosterona, no efecto sobre el cortisol (glandula adrenal <i>in Vitro</i>)</p> <p>↑Aldosterona estimulada por ACTH, no efecto en la secreción basal de aldosterona ni cortisol (<i>in vivo</i>)</p>
Adrenomedulina	<p>↓ Aldosterona estimulada por AGT II (células adrenales)</p> <p>↑Aldosterona (glandula adrenal <i>in Vitro</i>)</p>

## 3.2. BASES MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES QUE PERMITEN INTERACCIONES PARACRINAS CORTICOMEDULARES

Tanto el íntimo contacto entre las células de la corteza y la médula, como la peculiar inervación y vascularización de la glándula hacen posible esta interrelación.

La sangre fluye centrípetamente desde la zona glomerulosa, pasando por la zona fascicular y reticular hacia la médula, donde drenan a las venas medulares. De esta manera, puede llegar a la médula suficiente cantidad de corticosteroides, necesarios para la síntesis de adrenalina.

### **3.2.1. Relación entre las células medulares y las células de la corteza**

Estudios de microscopía electrónica han puesto de manifiesto el íntimo contacto entre las células de la corteza y la médula.

En 1968 se observó por primera vez la presencia de células medulares en la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal de ratas (160-162). Actualmente se sabe que las células cromafines pueden encontrarse en todas las zonas de la corteza suprarrenal adulta, formando irradiaciones desde la médula hasta la corteza, incluso extendiéndose hasta la región subcapsular. Pueden estar como células aisladas, o agruparse formando islotes de grupos de células cromafines. Frecuentemente se agrupan alrededor de grandes vasos medulares. Es decir, las células corticales están invadidas por estroma de la médula, de forma que estas últimas están en contacto directo con las células cromafines (163-166).

Las células corticales también se localizan en la médula. Pueden formar islotes pequeños y grandes, rodeados de tejido cromafín o manteniendo algo de contacto con el resto de la corteza. Frecuentemente se agrupan alrededor de grandes vasos en la médula adrenal.

Las células corticales y medulares no están separadas por tejido conectivo o intersticio. El borde que une la zona reticular con la zona medular es muy irregular y no se ha observado la presencia de una cápsula, estructuras vasculares o tejido fibroso que separe la médula de la corteza.

Este estrecho contacto entre los dos tipos celulares permite un extenso contacto para interacciones paracrinas intraadrenales entre las células corticales y las células cromafines (165).

### **3.2.2. Uniones GAP en la corteza y médula adrenal**

Existen uniones GAP en todas las células de la corteza y médula permitiendo el paso del citoplasma de una célula al citoplasma de otra célula tanto de corrientes

eléctricas, como iones y moléculas hidrosolubles de hasta 1000 dalton (167). Estas uniones GAP están implicadas en la zonificación de la corteza adrenal (86).

Cada unión GAP está formada por dos hemicanales o conexones, cada uno aportado por una de las dos células de contacto. Cada hemicanal está compuesto por seis subunidades proteicas denominadas conexinas. Las conexinas se sintetizan en el retículo endoplásmico, forman un hemicanal hexamérico, y posteriormente son transportadas a la superficie celular (168). Las conexinas son codificadas por una familia de genes compuesta por al menos 20 genes diferentes en el humano y se denominan con el prefijo Cx seguido de un número que indica el peso molecular teórico aproximado.

Las conexinas predominantes en la corteza adrenal son las conexinas 43 (Cx43). Su distribución no es uniforme, hallándose más en la zona fasciculada y reticular, y menos en la glomerular (86). La ACTH estimula la formación de uniones GAP y la apertura de las mismas (169, 170).

En la embriogénesis, células procedentes de la cresta neural migran al interior de la glándula dando lugar a las células cromafines. Estas células procedentes de la cresta neural contienen gran cantidad de Cx43, pero una vez que han formado la médula, expresan sobre todo Cx36, y menos cantidad de Cx43 (171, 172). Esto hace posible que la migración de las células neurales esté influenciada por las células corticales. De hecho, probablemente, esta interacción condiciona la cantidad y localización de las células de la cresta neural en la médula adrenal del adulto (97, 173).

Ratas sometidas a un estímulo estresante aumentan la expresión de Cx36 y Cx43 en las células cromafines. Estas comunicaciones célula-célula podrían ser reguladas por factores liberados de la corteza, así como por ACTH, ya que aumentan la cantidad de las Cx 43 (174).

### **3.2.3. Inervación de la corteza suprarrenal por neuronas de la médula**

La corteza adrenal está ricamente innervada, especialmente la zona glomerulosa. La inervación aferente de la corteza deriva de dos fuentes diferentes. La primera fuente procede de fibras nerviosas con el cuerpo neuronal en la médula. Originariamente, las células de la cresta neural terminan en la glándula suprarrenal, siendo la corteza el objetivo de los nervios postganglionares. La segunda fuente es

extraadrenal: los cuerpos celulares están fuera de la glándula y entran a ella junto con los vasos sanguíneos o junto con el nervio esplácnico.

La corteza suprarrenal está ricamente innervada, especialmente la zona glomerular. Se ha observado que hasta un 20% de las terminaciones nerviosas de las fibras nerviosas en la zona glomerulosa están libres, es decir, que pueden sinaptar directamente con las células productoras de esteroides, liberando gran número de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y otros péptidos a la corteza (175-177).

Esto sugiere que existen conexiones no sinápticas que regulan la esteroidogénesis de forma paracrina entre las fibras nerviosas y las células corticales.

#### **3.2.4. Vascularización de la glándula suprarrenal**

La glándula suprarrenal recibe irrigación de pequeñas arteriolas que proceden de la aorta, de la arteria renal y la arteria frénica inferior. Las arteriolas forman un plexo subcapsular, desde donde se distribuyen 2 tipos de vasos: los vasos de paredes finas sinusoidales que irrigan la corteza y las arterias medulares que llevan sangre directamente a la médula adrenal.

La cantidad de sangre que fluye a las glándulas suprarrenales está controlada por diferentes mecanismos hormonales y neurales. Por ejemplo, la estimulación del nervio esplácnico produce un aumento en el flujo suprarrenal, mediante la liberación de neuropéptidos (178, 179). Algunos de estos neuropéptidos tienen efectos sobre la vascularización de la glándula suprarrenal, como VIP y met-enkefalinas, que producen vasodilatación, mientras que otras, como el neuropéptido Y causan vasoconstricción. Otros neuropéptidos no tienen ningún efecto, como la sustancia P, neurotensina y leu-enkefalina (180, 181). ACTH produce un aumento del flujo suprarrenal (182, 183), a través de los mastocitos, que se encuentran en la capsula adrenal, sobre todo donde penetra la arteria suprarrenal. Los mastocitos contienen histamina y 5-HT, que son potentes componentes vasoactivos (184, 185).

Otros productos del endotelio vascular, como el óxido nítrico, la endotelina-1 y la adrenomedulina, también están implicadas en la regulación local del flujo suprarrenal. La disminución del óxido nítrico produce una disminución del flujo tanto en la corteza como en la médula. La presencia o ausencia de óxido nítrico es independiente de ACTH. La endotelina también regula el tono vascular, ejerciendo un efecto vasoconstrictor, mientras que la adrenomedulina produce vasodilatación

(159). La interacción entre todos estos agentes, producirá un control integrado del flujo a la glándula suprarrenal.

### 3.3. IMPLICACIONES CLÍNICAS

Los **glucocorticoides** están regulados principalmente por la ACTH pituitaria. Sin embargo, pacientes que reciben elevadas dosis de dexametasona no presentan elevación de glucocorticoides plasmáticos en respuesta al estrés de una cirugía, aunque los niveles de ACTH y CRH prequirúrgicos sean indetectables (186). Esta elevación fisiológica de cortisol puede elevarse directamente a través de la estimulación de la corteza adrenal. Las concentraciones de TNF y IL-6 están elevadas durante la cirugía y permanecen elevadas durante 48-72h, el tiempo en que también está elevado el cortisol.

Pacientes con sepsis bacteriana y enfermedades crónicas con elevación persistente de los niveles de cortisol presentan una disminución de ACTH. Citoquinas como IL-6 pueden ser importantes como potentes activadores del eje HHA y puede exceder la potencia de acción de CRH (187). El efecto pituitario de IL-6 parece ser agudo, mientras que el efecto sobre la corteza es de larga duración, ya que del 10 al 20% de los pacientes críticamente enfermos, desarrollan insuficiencia adrenocortical (188, 189).

Pacientes depresivos presentan una hipersecreción de cortisol, siendo la respuesta de ACTH a CRH normal. Factores estresantes pueden actuar directamente en la glándula adrenal, contribuyendo a la estimulación en la secreción de cortisol. Además, diferentes neuropéptidos y neurotransmisores secretados por la médula adrenal tienen un importante papel en el desarrollo de enfermedades psiquiátricas (190)

La activación del **sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA)** depende, no solamente del volumen y presión sanguínea, sino de la liberación de renina y aldosterona por otras vías. El sistema RAA puede activarse vía simpática (116). La regulación neural e intraadrenal de la producción de aldosterona tiene importantes implicaciones clínicas. Las diferencias en la respuesta adrenal a la angiotensina II con el balance de sodio puede estar regulado por una disminución en la inhibición dopaminérgica (191).

En casos de hiperaldosteronismo idiopático e HTA esencial, existe un aumento de la sensibilidad adrenocortical a la angiotensina con niveles bajos circulantes de angiotensina (192). Esto puede estar producido por una disminución de la actividad dopaminérgica, que podría dar lugar a un aumento en la secreción de aldosterona en respuesta a niveles bajos de aldosterona.

La arginina, otros productos secretados por la médula adrenal, factores endoteliales y humorales regulan la secreción de aldosterona en la glándula adrenal.

La regulación intraadrenal de los **andrógenos** tiene varias implicaciones clínicas. Existe una discrepancia entre los niveles de ACTH en plasma y la secreción de andrógenos durante la adrenarquia. La regulación de la producción de andrógenos por el sistema simpato-adrenal puede ser particularmente importante en este momento. La IL-6 puede ser un factor local que estimule la producción de C19 esteroides. El receptor de IL-6 se expresa en la zona reticular, estimulando la producción de DHEA (193). Las citoquinas producidas en la zona reticular pueden participar en la expresión de MHC de clase II, relacionado con la diferenciación y apoptosis celular de la corteza (194).

### **3.4. INTERACCIÓN INTRAADRENAL DURANTE EL ESTRÉS**

La respuesta fisiológica al estrés da lugar a una serie de cambios a corto y largo plazo en el sistema cardiovascular, metabólico, inmunitario, endocrino y somatosensorial, que permiten que el organismo se adapte a una serie de estímulos tanto físicos como fisiológicos (195).

La respuesta inmediata al estrés se encuentra mediada por el hipotálamo y el sistema nervioso autónomo produciéndose aumento de la frecuencia y de la fuerza de contracción cardíacas, aumento del flujo sanguíneo en el músculo esquelético, contracción esplácnica, aumento del número de eritrocitos circulantes y aumento de la frecuencia respiratoria y dilatación bronquial. Todos estos cambios aseguran la perfusión sanguínea a los órganos vitales como corazón y cerebro, así como al pulmón y músculo esquelético. Si el estímulo persiste, se ponen en marcha otros sistemas de respuesta a más largo plazo, entre los que destaca el aumento de la secreción de cortisol por la corteza adrenal. Los glucocorticoides refuerzan las acciones del sistema nervioso simpático sobre el sistema circulatorio y contribuyen a mantener los niveles de glucemia necesarios.

La respuesta endocrina al estrés es la activación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal y el sistema simpático medular, que producen un aumento de la secreción de hormonas suprarrenales, particularmente glucocorticoides en la corteza y adrenalina de la médula suprarrenal (77, 196). La respuesta al estrés de la médula y de la corteza está sincronizada, aun siendo dos sistemas embriológicamente diferentes y regulados por diferentes mecanismos.

La respuesta de la glándula suprarrenal al estrés se ha estudiado en diferentes modelos de animales. El estrés induce tanto la liberación de catecolaminas por estimulación del nervio esplácnico, como la expresión de RNAm de PNMT. Sin embargo, no se requiere la integridad del nervio esplácnico para aumentar la expresión de RNAm de PNMT. Esto demuestra la gran importancia de las interacciones intra-adrenales (58, 197, 198). La expresión de PNMT durante el estrés depende de las altas concentraciones de glucocorticoides de la glándula suprarrenal (78). De hecho, ratones inconscientes que no producen CRH y en los que la síntesis de glucocorticoides es muy baja, no expresan RNAm PNMT (59, 199).

La innervación esplácnica, además de estimular la médula adrenal, también influye en la corteza suprarrenal activando la liberación de corticosteroides mediante dos mecanismos: estimulación directa esplácnica y a través de la liberación de catecolaminas y otros neuropéptidos por la médula adrenal (110, 200, 201). Este efecto directo en el control de la esteroidogénesis, ACTH independiente, por la innervación adrenomedular puede ser un importante mecanismo en la sincronización de la respuesta de estos dos sistemas endocrinos (36). De hecho, alteraciones en la biosíntesis de catecolaminas producen cambios estructurales y funcionales no sólo en la médula, sino también en la corteza, dando lugar a células con un mayor número de liposomas, mitocondrias tubulares, disminución en la producción de esteroides y disfunción en la respuesta al estrés (79).

La divergencia de ACTH y la respuesta de la corteza suprarrenal puede ponerse de manifiesto también ante la exposición a un estrés de forma crónica. Cuando el estrés es intermitente y prolongado se produce una hiperplasia de la región externa de la zona fasciculada, una hipertrofia de la zona interna de la zona fasciculada y de la médula, y una disminución en el tamaño de las células de la zona glomerulosa, con la finalidad de mejorar la sensibilidad a ACTH (45, 202).

En conclusión, la regulación de la función medular y especialmente de PNMT por los glucocorticoides de la corteza está bien establecida. Así mismo, la liberación



de cortisol no sólo depende de la activación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal, sino de la inervación del nervio esplácnico y de la liberación de catecolaminas y neuropéptidos desde la médula suprarrenal. Esta interacción bidireccional es fundamental para una respuesta sincronizada ante una situación de estrés.

## 4.-EVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA SUPRARRENAL

El primordio de la glándula suprarrenal fetal puede reconocerse a las 3-4 semanas de gestación fusto por encima del mesonefros en desarrollo. A las 5-6 semanas, se desarrolla la cresta gonadal para formar las células esteroidogénicas de las gónadas y la corteza suprarrenal: las suprarrenales migran a peritoneo, y las gonadales lo hacen en dirección caudal. En las semanas 6-8 de gestación, la glándula aumenta de tamaño rápidamente, las células de la parte más interna de la corteza se diferencian para formar la zona fetal y el borde externo permanece como zona definitiva, estableciéndose así tres zonas: la subcapsular o definitiva, una de transición, y otra zona, la más grande, denominada zona fetal o zona X. Esta última zona secreta fundamentalmente andrógenos, que servirán como precursores para la biosíntesis de los estrógenos placentarios durante el embarazo. La médula se forma por la migración, hacia la 7ª semana, de células procedentes de la cresta neural, y por tanto neuroectodérmicas, simpáticas, que se diferencian en feocromoblastos en las glándulas suprarrenales. Mas tarde, hacia la 20ª semana, estas células se organizan en grupos en el centro de la glándula.

Las suprarrenales del recién nacido a término son muy grandes, ya que pesan 7-9 gr, y suponen el 0.5% del peso corporal, mientras que en el adulto suponen 0.005%.

Al nacer, la corteza fetal más interna supone el 80% de la glándula y la parte externa de la corteza, la verdadera, el 20%. En el momento del nacimiento, la corteza empieza a involucionar, y sufre una reducción del 50% al mes de edad, y del 75% al año de vida. Por el contrario, la médula es relativamente pequeña en el nacimiento y aumenta de tamaño de forma proporcional durante los primeros 6 meses de vida postnatal. Al año, las glándulas suprarrenales pesan cada una menos de 1 gr. El crecimiento suprarrenal desde entonces produce unas glándulas adultas que alcanzan

un peso conjunto de 8gr. La zona glomerulosa y fascicular no se desarrollan definitivamente hasta los 3 años de edad, y la reticular hasta después de la adrenarquia, los 8 años, aproximadamente, debido a la involución de la zona fetal. A partir de la edad de 5-7 años (inicio de la adrenarquia), el peso aumenta progresivamente hasta alcanzarse la talla adulta al final de la pubertad.

El crecimiento suprarrenal precoz parece ser independiente de la ACTH, pero al menos desde la mitad hasta el final de la gestación, la ACTH es esencial para el crecimiento y la maduración suprarrenales.

La diferenciación de los tipos celulares que constituyen las distintas capas de la corteza es el resultado de factores locales, lo que explicaría la proliferación ocasional de restos ectópicos de células corticales tras una adrenalectomía total, o la existencia de glándulas suprarrenales accesorias.

La irrigación de las suprarrenales depende de varias arterias que proceden de la aorta, la frénica inferior y las renales. Penetran en la parte externa de la corteza, desde donde la sangre fluye hacia la médula, con un flujo de 0.5 mL/min. El drenaje de la sangre venosa se lleva a cabo por una única vena que sale de la médula. La vena suprarrenal derecha desemboca en la vena cava y la izquierda en la vena renal. Por tanto, la sangre periférica entra en la suprarrenal atravesando la corteza, y llevando sus productos de secreción a la médula. Estos productos secretados influyen en la biosíntesis de catecolaminas de la médula. Existe así, una unidad anatómica y funcional, encaminada a proporcionar una respuesta funcional integrada.

## II.-HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA

---

### 1. INTRODUCCIÓN

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) define un grupo de enfermedades congénitas en las que se produce un error en la esteroidogénesis suprarrenal. La síntesis de glucocorticoides, mineralcorticoides y andrógenos puede verse afectada de forma global o parcial, dando lugar a un grupo heterogéneo de cuadros clínicos, que pueden manifestarse en el periodo neonatal, durante la infancia, la adolescencia o en la edad adulta. Las alteraciones en la acción enzimática darán lugar a una disminución en la síntesis de las hormonas situadas por debajo del bloqueo y un aumento de los productos previos a dicho bloqueo. El bloqueo enzimático afecta siempre en mayor o menor grado a la síntesis de cortisol, condicionando un aumento compensador de adrenocorticotropina (ACTH), que al actuar ya tempranamente durante el desarrollo embrionario y fetal implica una hipertrofia de la glándula suprarrenal.

Se conocen distintas formas de HSC: el 90-95% de los casos se debe a un déficit de la enzima 21-hidroxilasa (21-OH), producida por una alteración del gen CYP21A2 que la codifica. Otras causas son: deficiencia de la 11  $\beta$ -hidroxilasa, 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, déficit de P450c17 (17 $\alpha$ -hidroxilasa, aislada o combinada con la deficiencia de 17,20 liasa), de StAR (hiperplasia lipoidea), colesterol desmolasa y de la P450 oxidorreductasa (203-205), menos frecuentes.

### 2.-PREVALENCIA

La incidencia de la HSC debida a un déficit de 21-OH es variable según las poblaciones estudiadas y la recogida de datos, extraídos o no de los programas de detección precoz, ya que los niños varones con HSC pueden pasar desapercibidos en la primera exploración y posteriormente, cuando se instaura el cuadro de pérdida salina, fallecer súbitamente sin que se realice el diagnóstico.

Es la metabolopatía hereditaria más frecuente, con una incidencia general para las formas clásicas de 1/15.000 (206, 207). La prevalencia en poblaciones donde se realiza screening neonatal es muy variable, desde 1/23.000 en Nueva Zelanda (208) hasta 1/280 en Yupik, Alaska (209). En Europa la incidencia general oscila entre 1/10.000 y 1/23.000 (210-212)

La frecuencia para las formas no clásicas de 21-hidroxilasa es mucho más frecuente que las formas clásicas (213, 214), siendo especialmente frecuente en los judíos Ashkanazis (1/27), hispánicos (1/53), yugoslavos (1/63), italianos (1/333) y 1/100-1/1000 en la población general caucásica, ascendiendo al 2% en mujeres con signos de hiperandrogenismo (213, 215-217). Datos de nuestra población, estimados a partir de la prevalencia de la mutación más frecuente de las formas tardías, Val281Leu, en muestras de cribado neonatal, indican una frecuencia de 1/225 (218).

La frecuencia de portadores de mutaciones severas es de 1/50 a 1/60 y de las formas tardías 1/5 en la población caucásica y también en nuestra población. En la Comunidad Autónoma de Madrid, el programa de detección precoz se inició con un estudio piloto en 1987, estableciéndose como práctica habitual en noviembre de 1990. La incidencia observada es de 1/9.485 recién nacidos (219)

### 3.-FORMAS CLÍNICAS

Existen 3 formas clínicas de presentación:

#### **3.1.-FORMA CLÁSICA:**

##### **3.1.1. CON PÉRDIDA SALINA:**

Es la forma más grave de la enfermedad. El 75% de los casos de la forma clásica pueden presentar pérdida salina, como consecuencia de la deficiencia en la síntesis de mineralcorticoides (220). El déficit de aldosterona produce una pérdida renal de sodio, retención de potasio, natriuresis elevada y depleción de la volemia. Generalmente debuta entre los 5 y 10 días de vida, siendo más intenso cuanto más tardío sea el diagnóstico. Clínicamente se caracteriza por un cuadro progresivo de anorexia, ausencia de ganancia ponderal, decaimiento, poliuria y vómitos. Si no se

reconoce el cuadro, y no se pone el tratamiento adecuado precozmente, puede evolucionar en poco tiempo a un cuadro severo de deshidratación hipotónica y shock hipovolémico de consecuencias letales. Analíticamente se caracteriza por acidosis metabólica hiponatémica e hiperpotasémica, disminución de aldosterona, elevada actividad de renina plasmática (ARP) con cociente ARP/aldosterona elevado. La placenta, la función renal y suprarrenal materna permiten mantener al feto afecto de HSC en una situación de homeostasis electrolítica, por ello el cuadro de pérdida salina no se desarrolla hasta después del nacimiento(221).

Los pacientes tienen un déficit severo de cortisol asociado que agrava y potencia el déficit de mineralcorticoides. Ello se debe a que los glucocorticoides aumentan la contractilidad muscular esquelética, mejoran la contractilidad cardíaca, el gasto cardíaco y la sensibilidad a la acción de las catecolaminas. En ausencia de glucocorticoides estos efectos no se producen, disminuye el gasto cardíaco, el filtrado glomerular y la capacidad para excretar agua libre.

El exceso de secreción suprarrenal de andrógenos no afecta a la diferenciación de los genitales externos en el varón. Sin embargo, el hiperandrogenismo en las niñas produce una virilización de los genitales externos. En las mujeres afectas, cuando la suprarrenal fetal comienza a producir andrógenos en cantidades elevadas, el seno urogenital se encuentra en proceso de septación y los niveles de andrógenos pueden impedir la formación de vagina y uretra como estructuras separadas e independientes. Posteriormente, los andrógenos actuarán sobre sus receptores induciendo hipertrofia de clítoris, fusión de los labios mayores y migración rostral del orificio uretral-vaginal. Se produce una progresiva y variable virilización de los genitales externos que lleva a la aparición de genitales ambiguos. El máximo grado de virilización dará lugar a un fenotipo masculino con hipertrofia reniforme del clítoris, hipospadias perineal y labios mayores escrotalizados con ausencia de testes. Estas niñas muy virilizadas pueden ser erróneamente identificadas como varones con critorquidia. Las estructuras derivadas del conducto de Wolff requieren concentraciones locales mucho más altas de testosterona que los genitales externos para lograr su diferenciación completa. Las estructuras müllerianas, al no ser órganos diana para la actuación androgénica, se desarrollan con normalidad, por lo que el desarrollo del útero, trompas, y los 2/3 internos de la vagina son normales en la niña. En el varón, podemos encontrar desde una simple hiperpigmentación melánica no racial hasta macrogenitosomía (222).

El grado de gravedad de la virilización no guarda relación con el grado de severidad de pérdida salina.

### **3.1.2. SIN PÉRDIDA SALINA/VIRIZANTE SIMPLE**

Esta forma clínica se presenta en el 25% de los casos de déficit clásico de 21-hidroxilasa, y se caracteriza por un déficit en la síntesis de cortisol y un exceso en la producción de andrógenos suprarrenales desde la época fetal. A diferencia de la forma con pérdida salina, la síntesis de aldosterona no está tan gravemente alterada, por lo que se mantiene la homeostasis del sodio a pesar de que los niveles de renina pueden estar elevados. Estos pacientes son aquellos con una virilización severa pero sin signos clínicos de pérdida salina. Las niñas son identificadas precozmente por la virilización de los genitales externos, pero los niños y las niñas con una virilización más leve de los genitales externos suelen diagnosticarse más tardíamente, en la infancia, cuando se ponen de manifiesto los signos de hiperandrogenismo. Las niñas tienen genitales externos con un grado variable de virilización.

En la etapa posnatal, el exceso de andrógenos continua virilizando los genitales y determina la aparición de una pseudopubertad precoz. Los signos de hiperandrogenismo incluyen pubarquia, axilarquia, aumento del olor corporal, acné severo crecimiento exagerado del pene e hipertrofia de clítoris. En ocasiones puede añadirse un cuadro de pubertad precoz central asociado por privación androgénica hipotálamo-hipofisaria, que hace que se active el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal.

Un mal control de la enfermedad puede dar lugar en las niñas a acné, hirsutismo y disfunción ovárica. La mayoría de las mujeres con HSC tienen la menarquia a una edad normal, aunque presentan en la edad adulta oligomenorrea y una disminución de la fertilidad. Los factores que pueden contribuir a una baja fertilidad son factores hormonales, como un inadecuado control del hiperandrogenismo, que induce ciclos anovulatorios, alteración del eje hipotálamo-hipofiso-ovárico, ovario poliquístico, excesiva producción ovárica de andrógenos y activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y factores anatómicos, como un introito inadecuado o alteraciones referidas al tratamiento quirúrgico (223, 224).

Adolescentes y adultos varones con HSC clásica pueden tener una pubertad normal, con función testicular normal, espermatogénesis normal y fertilidad. Sin embargo, hasta el 30% de los pacientes adultos muestran infertilidad (225). Pacientes

deficientemente tratados presentan nódulos testiculares, que destruyen progresivamente los túbulos testiculares y las células de Leydig, con bajas concentraciones de testosterona, y aumento de las gonadotrofinas. Estos nódulos aumentan en los periodos de elevación de ACTH y disminuyen con el tratamiento glucocorticoideo (226, 227). El aumento prolongado de andrógenos suprarrenales, que son aromatizados periféricamente a estrógenos, pueden producir la supresión de la secreción de gonadotrofinas alterando el crecimiento y funcionamiento testicular, produciendo atrofia testicular y azoospermia (225, 228-231).

En ambos sexos, el exceso de andrógenos sin tratamiento progresaría a pubarquia precoz, pubertad heterosexual en la niña, aceleración de la maduración ósea y del crecimiento lineal, cierre precoz de las epífisis y talla baja en el adulto (225, 232-235).

Existe una variación interindividual importante en los síntomas de hiperandrogenización pre y posnatal, que se podría explicar por las diferencias en los niveles absolutos de precursores androgénicos o una variable conversión de los precursores en andrógenos más potentes. Las variaciones en la expresión o en la actividad del receptor androgénico pueden contribuir a explicar la variabilidad en el genotipo. Se ha demostrado una correlación inversa entre el hirsutismo y un menor número de secuencias repetitivas CAG en el exón 1 del gen del receptor androgénico (224, 236).

### **3.2. FORMA NO CLÁSICA/TARDÍA:**

Es una deficiencia enzimática parcial, con actividad de 21-hidroxilasa suficiente para la síntesis de mineralocorticoides y cortisol, que se acompaña de una superproducción de andrógenos de aparición tardía.

Las niñas al nacimiento presentan genitales femeninos normales. Clínicamente se manifiesta por un cuadro invariable de hiperandrogenismo que puede hacerse evidente durante la infancia, adolescencia o incluso comenzar en la edad adulta. Habitualmente se produce en la segunda infancia o en edades peri o postpuberales. Generalmente estos síntomas de hiperandrogenismo son poco marcados y coincidentes con el inicio de la adrenarquia, ya que en la adrenalquia aumenta la actividad de 17 $\alpha$ -hidroxilasa y disminuye la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, lo que favorece la producción suprarrenal de andrógenos (237, 238).

Suele cursar con pubarquia prematura, aceleración de la edad ósea, talla baja adulta, hirsutismo, acné, irregularidades menstruales, alopecia en región temporal e infertilidad. Suelen asociar oligomenorrea y ovario poliquístico (237, 239).

Los varones pueden presentar oligoozospemia y disminución de la fertilidad. Nunca existe síndrome de pérdida salina ni virilización prenatal. Suelen detectarse en el estudio de hiperandrogenismo, aunque sólo un pequeño porcentaje de éstos (5-10%) presentan mutaciones de CYP21A2 en ambos alelos (240, 241).

### **3.3. FORMA CRÍPTICA:**

Algunos pacientes, tanto varones como mujeres, pueden no manifestar síntomas de la enfermedad, aunque presenten alteraciones bioquímicas y genético-moleculares comparables a los que tienen síntomas. Generalmente se detectan al realizar estudios de familiares afectados o en programas de screening neonatal. El seguimiento longitudinal de estos casos a menudo muestra que los signos de hiperandrogenismo aparecen posteriormente (222).

### **3.4. PORTADORES:**

Son aquellos pacientes con mutación en un solo alelo. Son detectados generalmente en el estudio de familiares afectados o por signos de hiperandrogenismo. (242-244). Las características fenotípicas de estos pacientes son indistinguibles de las formas tardías, así como la edad de aparición de los síntomas. Sin embargo, parece que la pubarquia prematura y la aceleración de la edad ósea están siempre presentes en los niños con formas tardías, mientras que otros signos de hiperandrogenismo como hirsutismo, acné, irregularidades menstruales... son más frecuentes en los portadores (245).



## 4.-DIAGNÓSTICO

### 4.1. DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO

El diagnóstico de HSC por déficit de 21-OH se basa en la demostración de valores aumentados de 17-OHP, el esteroide previo al bloqueo enzimático.

En el periodo neonatal los valores normales son <35 ng/ml en suero. En las formas clásicas, la 17-OHP se encuentra generalmente por encima de 20 ng/ml a las 48 horas de vida, aunque generalmente alcanzan valores superiores a los 30-100 ng/ml. En el prematuro, sobre todo si es menor de 30 semanas de edad gestacional, los valores de 17-OHP pueden elevarse hasta 18 veces los de un recién nacido a término. Se debe a una disminución de la actividad de la 3 $\beta$ hidroxiesteroide-deshidrogenasa y de 11- $\beta$  deshidrogenasa que justifica la elevación de estos metabolitos con normalización espontánea en su evolución (246, 247). El diagnóstico no debe hacerse en sangre de cordón porque las tasas de 17-OHP están elevadas, generalmente entre 10 y 30 ng/ml y reflejan en más del 80% las concentraciones maternas. Durante el periodo neonatal no es necesario realizar el test de ACTH, ya que los valores de 17-OHP suelen estar francamente elevados y una hiperestimulación con ACTH podría producir mayor aumento de la 17-OHP y desencadenar una crisis de pérdida salina al competir en el túbulo renal con la aldosterona.

En la forma no clásica, el bloqueo es menos severo y la acumulación de 17-OHP puede ser muy variable. Los niveles basales de 17-OHP pueden no diferir de los valores normales, pero suelen estar elevados durante el pico diurno de producción de cortisol, por lo que los valores de la primera hora de la mañana suelen ser los más informativos. Excluyendo el periodo neonatal, se consideran normales valores basales inferiores a 2-3 ng/ml (248, 249). El test de estimulación con ACTH se recomienda realizarlo en el periodo prepuberal, ante la presencia de pubarquia prematura con aceleración del crecimiento y de la edad ósea con 17-OHP basal superior a 1 ng/ml y en la adolescencia o periodo pospuberal, ante una 17-OHP superior a 2 ng/ml en fase folicular aunque podría bajarse a 1,7 ng/ml para evitar falsos negativos de HSC (217). Se aconseja realizarlo también a los padres y familiares de cualquier paciente afecto de forma clásica o no clásica para detectar

formas cripticas. Los valores normales tras estímulo con ACTH (250 mcg de Synacthen iv) son inferiores a 3 veces el valor basal normal (6-9 ng/ml), siendo positiva cuando es mayor de 10 ng/ml (250). Las cifras de 17-OHP no distinguen las formas clínicas.

La crisis de pérdida salina requiere para su diagnóstico la determinación de iones (Na, K) equilibrio ácido-base en plasma, y natriuresis. En esta situación aparece hiponatremia, hiperpotasemia, acidosis metabólica y aumento de la natriuresis con deshidratación. La aldosterona está disminuida y aumenta la actividad de la renina plasmática. La determinación de otras hormonas en sangres como la testosterona total y libre, DHEA-S, androstendiona, cortisol o ACTH, pueden utilizarse como indicadores bioquímicos de la idoneidad de tratamiento.

#### **4.2 DESPIESTAJE NEONATAL**

El programa de detección precoz neonatal de déficit de 21-OHP tiene los siguientes objetivos (222, 251):

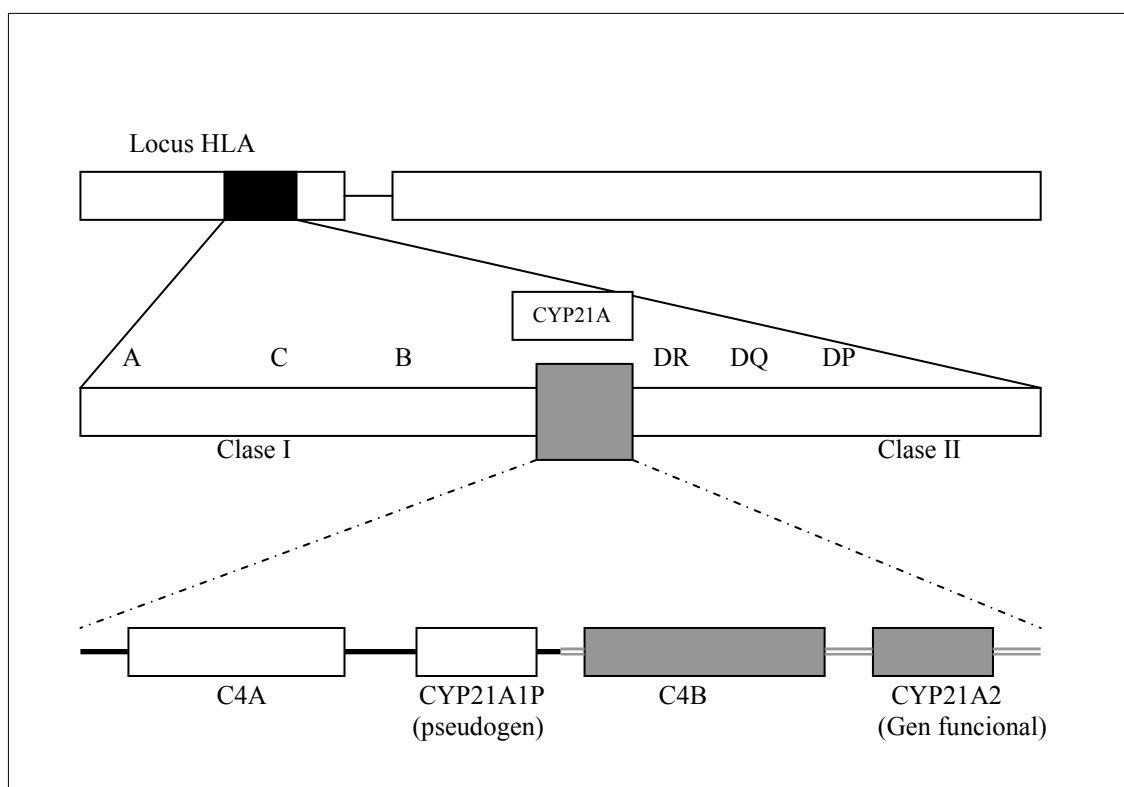
1. Anticiparse a la aparición de una crisis de pérdida salina grave y potencialmente mortal
2. Evitar la incorrecta asignación de sexo en una niña con genitales externos virilizados
3. Diagnosticar precozmente las formas virilizantes simples para evitar la hiperandrogenización durante la infancia
4. La detección precoz de las formas no clásicas no es el objetivo del screening pero en ocasiones pueden beneficiarse de este programa y un tratamiento precoz

La detección temprana de HSC se basa en la medición de la 17-OHP capilar, obtenida del talón de todos los recién nacidos en el área de cobertura a las 48 horas de vida. Los valores de normalidad varían para cada laboratorio en función de la técnica utilizada para su determinación. En los casos que den positivos, deberá realizarse posteriormente una confirmación diagnóstica. Existe una elevación fisiológica de 17-OHP en las primeras 24 horas de vida que rápidamente desciende a valores normales. Los prematuros y neonatos con enfermedades concomitantes, tienden a presentar niveles más altos de 17-OHP (247), con lo que conviene repetir la determinación 10-15 días más tarde.

Se ha demostrado que el screening reduce la edad de diagnóstico en los niños con HSC y disminuye la mortalidad asociada, ya que los recién nacidos afectados de forma clásica con pérdida salina se detectan muy precozmente, antes de que presenten los síntomas (252-254). El número de muertes potencialmente evitables con el programa de screening es muy variable, entre el 0-11,3% según las series así como difícil de estimar comparando poblaciones con screening de las que no (255-257). En cualquier caso, niños varones con el fenotipo pierde sal tienen más probabilidades de sufrir un retraso en el diagnóstico.

#### **4.3. GENETICA MOLECULAR**

El gen que codifica para la esteroide 21-OH (CYP21A2 o P450<sub>21</sub>, antes denominado CYP21B) es una citocromo P450 que convierte 17-OHP en 11-deoxicortisol y la progesterona en DOC. Se localiza en el complejo mayor de histocompatibilidad HLA clase III en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3), junto al pseudogen (CYP21A1P). Este último no codifica la enzima debido a la presencia de varias mutaciones. Los dos genes poseen 10 exones y presentan una elevada homología: un 98% en secuencias de exones y un 96% en secuencias de intrones (258). Los genes CYP21 se encuentran duplicados en tandem con los genes duplicados del factor 4 del complemento (C4A-CYP21A1P-C4B-CYP21A2) (Fig 6).



**Fig 6. Esquema del cromosoma 6 en humanos**, en el que se indica la localización del gen de la esteroide 21-OH en el locus HLA.

El gen duplicado de CYP21A2 en humanos no es funcional (pseudogen CYP21A1P). La duplicación en tandem favorece la posibilidad de apareamientos asimétricos y la consecuente generación de mutaciones por delección (híbridos pseudogen/gen) y conversión génica. Estos fenómenos son el principal origen de las mutaciones que producen deficiencia de 21-hidroxilasa. Estas mutaciones consisten básicamente en delecciones de CYP21A2, conversiones génicas o microconversiones (mutaciones puntuales).

El gen funcional CYP21A2 tiene un tamaño de 3,2 Kb y está constituido por 10 exones, dando lugar a un RNAm de aproximadamente 2Kb. La proteína tiene 500 aminoácidos y contiene un grupo prostético el grupo HEM. Es una monooxigenasa de esteroides en posición 21, de localización microsomal. Son importantes para su funcionalidad la región de anclaje a la membrana del microsoma y la región de centro activo donde se unen los sustratos, 17-OHP y progesterona, así como las regiones de interacción con los enzimas auxiliares o zonas de transferencia de electrones y protones.

CYP21A2 se expresa en el tejido suprarrenal dando lugar al enzima específico, aunque también se ha detectado expresión en linfocitos así como una actividad 21 hidroxilasa inespecífica, que puede 21 compensar parcialmente la deficiencia suprarrenal severa en el adulto (259).

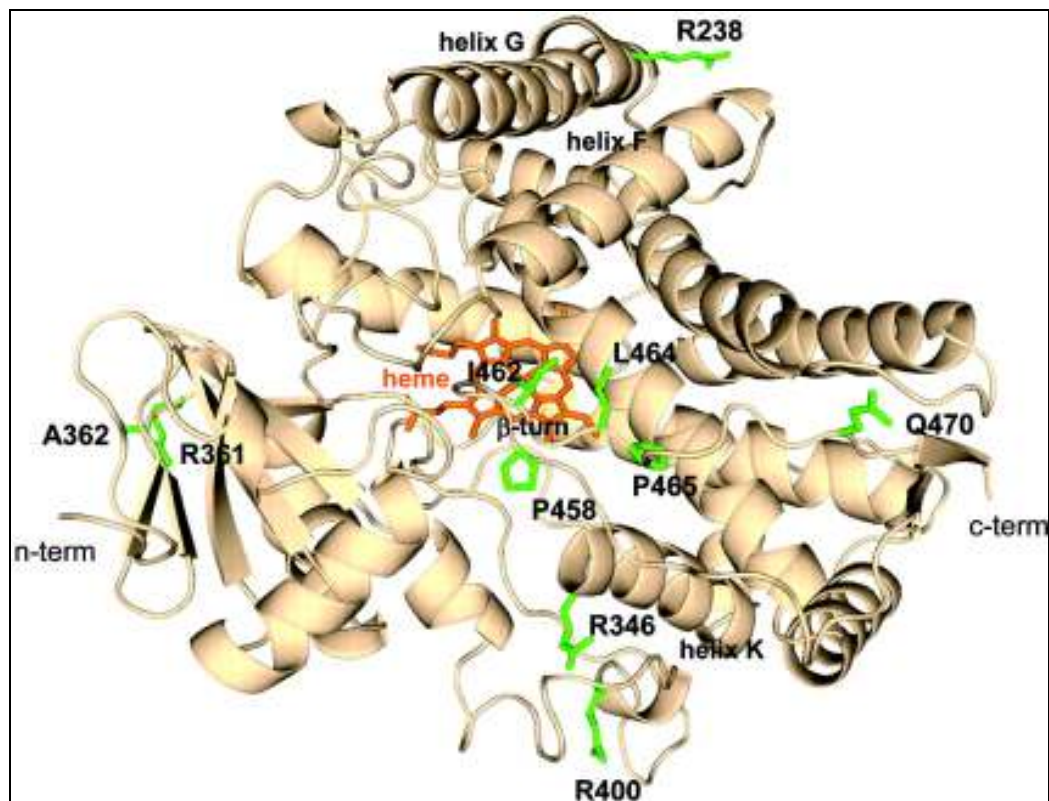


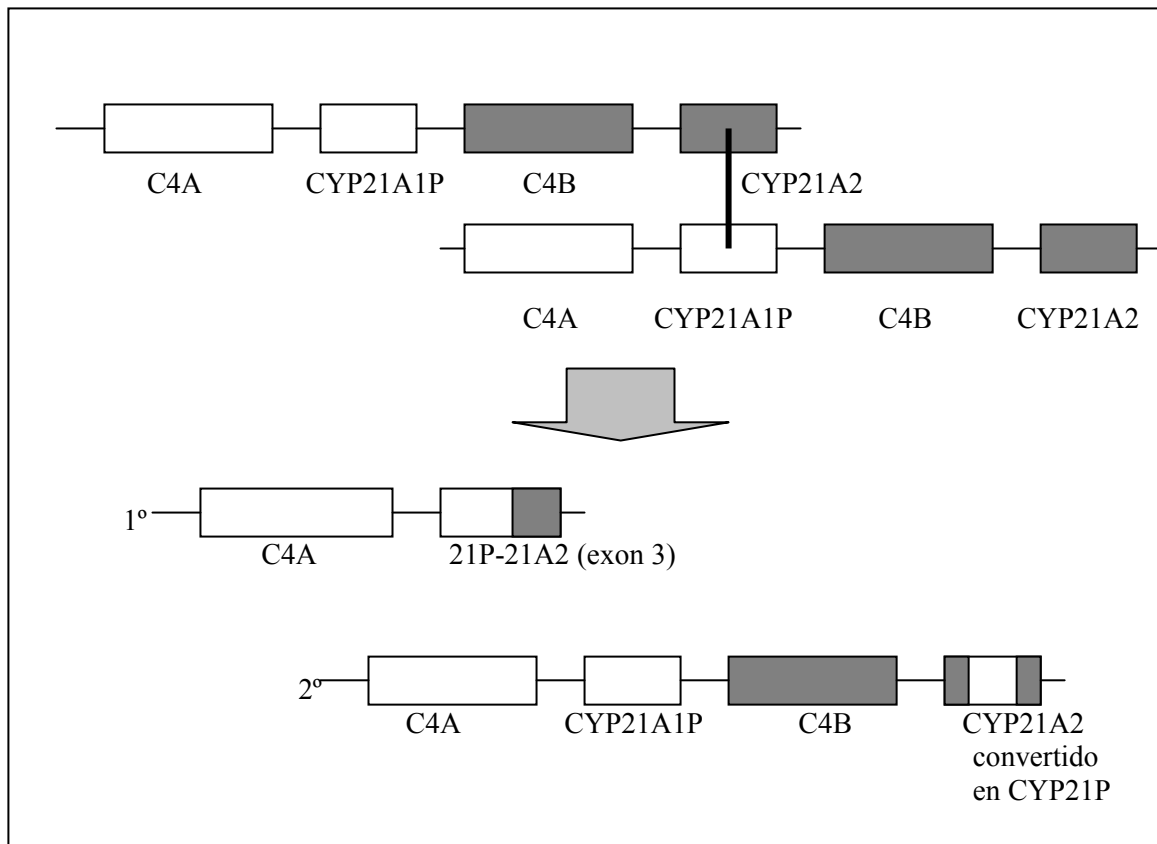
Fig 7. Esquema del gen de 21-hidroxilasa

El pseudogen tiene una alta homología con el gen funcional y contiene una serie de mutaciones puntuales, se ha documentado que algunas de ellas, cuando son transferidas al gen lo hacen no funcional. El análisis de esta batería limitada de mutaciones permite la detección de un gran número de alelos lo que facilita el estudio molecular, aunque obviamente hace imprescindible que exista un estricto control de la especificidad, ya que la amplificación de las secuencias del pseudogen hará que los alelos normales se detecten como falsos portadores de mutaciones.

Se han identificado más de 100 mutaciones de CYP21 que causan HSC (224).

La gran mayoría de las mutaciones que causan deficiencia de este enzima son el resultado de dos tipos de mecanismos: por una parte, la recombinación asimétrica en la meiosis, que se ve favorecida por la región duplicada de 30 Kb existente en el

locus de la 21-OH, que origina la delección completa de C4B y neta de CYP21A2 (224, 260) y por otro lado la conversión génica, que se transfieren mutaciones presentes normalmente en el pseudogen a CYP21A2 (261) (fig 8).



**Fig 8. Esquema de la recombinación asimétrica del gen y pseudogen**, dando lugar a la gran mayoría de los alelos mutado en 21-OH: la recombinación intragénica que da lugar a un híbrido pseudogen-gen, delección génica (1°), y la conversión de CYP21A2 en CYP21P (2°).

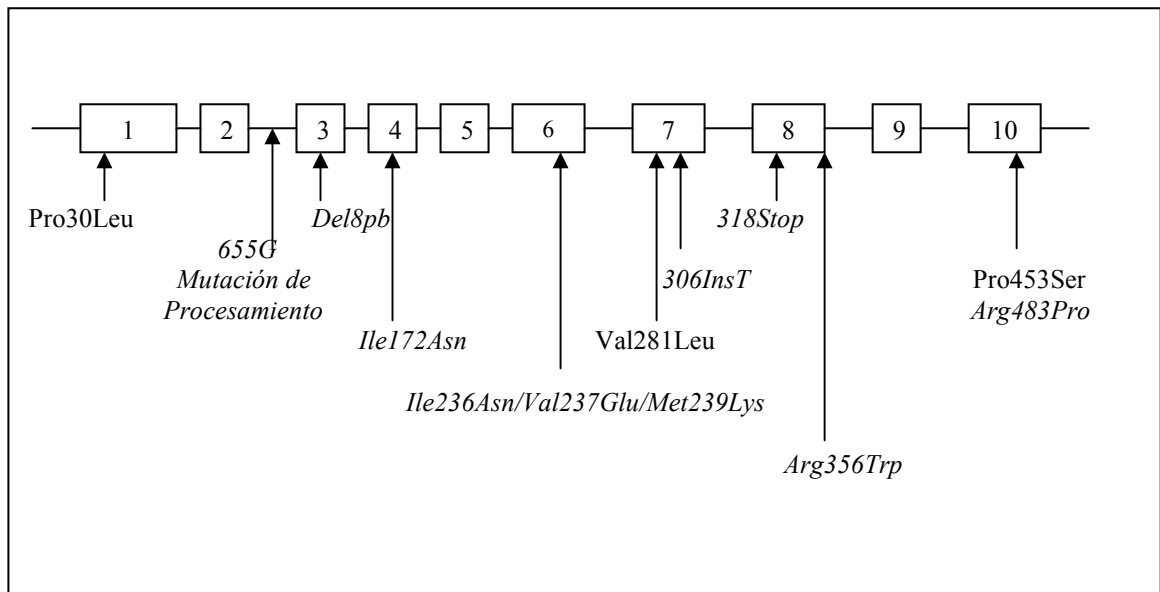
Las delecciones y duplicaciones del pseudogen mantienen un gen funcional por lo que, per se, no son las alteraciones responsables del déficit. Las “delecciones génicas” corresponden con un híbrido pseudogen-gen, que es no funcional y es el resultado de una recombinación intragénica. Los puntos de ruptura son diversos, localizándose entre los exones 3 y 4 en aproximadamente un 50% de los alelos con delección en nuestra población.

Las delecciones y grandes conversiones de CYP21A2 se encuentran fundamentalmente en pacientes con forma clásica y se identifica, aproximadamente de un 20 a un 33% de los alelos afectados entre caucásicos (262, 263).

Cuando el mecanismo de conversión génica actúa sobre una región limitada de la secuencia del gen funcional, el cambio introducido en el funcional se comporta como una aparente mutación puntual. Las mutaciones más frecuentes se encuentran

generalmente en el pseudogen, lo que sugiere que han sido transferidas al gen activo por medio de microconversiones. Los alelos mutados pueden ser portadores de microconversiones dobles por lo que pueden aparecer dos o más mutaciones puntuales (263, 264).

Las mutaciones que no se originan en el pseudogen representan mutaciones ocasionales y suelen aparecer en casos aislados.



**Fig 9. Esquema del gen 21-OH y sus 10 exones o zonas codificantes y regiones intrónicas.** Se indican las mutaciones puntuales que existen en el pseudogen de la 21-OH y pueden, por conversión génica, transferirse a CYP21A2, haciéndolo no funcional. Estas mutaciones puntuales se denominan microconversiones para diferenciarlas de las conversiones grandes que involucran a varios exones o a la totalidad del gen. Las mutaciones en cursiva afectan de forma severa a la enzima y se encuentran sobre todo en las formas clásicas de déficit de 21-OH. El resto de mutaciones dan lugar a una afectación moderada de la actividad enzimática y se asocian a formas leves o tardías de la deficiencia. Estas mutaciones se localizan en la región codificante, excepto la mutación 655A o C-G que se encuentra en el intrón 2 y afecta al procesamiento del RNAm.

Las mutaciones puntuales que por su frecuencia justifican el ser incluidas en una batería de cribado son Pro30Leu (exón 1), Val281Leu (exón 7) y Pro543Ser (exón 10), mutaciones puntuales leves propias de formas tardías; Ile172Asn (exón 4), de formas virilizantes simples; 655 A o C-G en intrón 2, delección de 8 pares de bases en exón 3, triple mutación en exón 6, 306insT (exón 7), Gln318Stop y Arg356Trp (exón 8), mutaciones severas asociadas a formas con pérdida sal, que en heterozigosis, pueden presentarse a formas tardías. Las delecciones, las conversiones grandes y las duplicaciones del gen también deben explorarse para una correcta

interpretación de los datos del estudio molecular. El especial mecanismo de producción de mutaciones existente en CYP21A2 explica la elevada frecuencia de esta enfermedad.

El estudio conjunto de deleciones, conversiones y microconversiones permite la caracterización del 93% de los alelos en las formas clásicas (un 95% con pérdida de sal y un 91% virilizantes simples) y el 85% de los alelos de formas no clásicas en nuestra población(265, 266). La informatividad del estudio molecular es elevada y, unicamente en un 5-8% de los pacientes con formas clásicas, este cribado permite la caracterización de un único alelo. Si se ha excluido la consanguineidad, es muy infrecuente (<1%) que no sea caracterizado ninguno de los alelos en una forma clásica. En estos casos, se reevaluaría el caso, como el análisis indirecto mediante microsatélites. El tiraje HLA para el análisis indirecto del gen 21-OH ha sido desplazado por los microsatélites y polimorfismos intragénicos y aunque se disponga de informatividad completa en el análisis directo, debe ser aplicado ya que permite evitar los problemas de la falta de amplificación de alelos, detectar posible contaminación de tejido materno, y el estudio de alelos con reordenaciones grandes. El análisis indirecto es muy útil para el diagnóstico prenatal pero con fines diagnósticos y la detección de portadores requiere el análisis directo.

En la deficiencia de la 21-OH se hace imprescindible el establecimiento de la segregación de alelos, y es la documentación de dos mutaciones segregadas la que dará el diagnóstico. No son infrecuentes los alelos con dobles mutaciones puntuales o pequeñas conversiones que afecten a dos mutaciones consecutivas.

## **5.-TRATAMIENTO**

### **5.1. TRATAMIENTO CON GLUCOCORTICOIDES**

Todos los pacientes con déficit clásico de 21-hidroxilasa y los pacientes sintomáticos de las formas no clásicas deben ser tratados con glucocorticoides, para suprimir el exceso de secreción de ACTH y reducir el exceso de producción de andrógenos suprarrenales.



La hidrocortisona es el fármaco de elección, ya que su potencia biológica es superponible a la del cortisol endógeno y tiene menor repercusión sobre el crecimiento y otros sistemas debido a su corta vida media.

Las dosis diarias de hidrocortisona han ido variando a lo largo de los últimos años. Hoy en día se prefiere dosis ligeramente superiores a la producción endógena de cortisol, 6 mg/m<sup>2</sup>/día (267). La dosis de hidrocortisona es de 10-20 mg/m<sup>2</sup>/día dividido en 3 dosis. Las dosis en menores de 6 meses son 20 mg/m<sup>2</sup>/día, de los 6 meses a los 2 años 10-15 mg/m<sup>2</sup>/día, y a partir de esa edad 8-10 mg/m<sup>2</sup>/día. Una vez terminado el crecimiento puede utilizarse prednisona (5-7,5 mg/día en dos dosis), o dexametasona (0.25-0.5 mg) en dosis única nocturna. Esta dosis debe aumentarse en situaciones de estrés (268).

De todas formas, la dosis necesaria para cada paciente está influenciada por múltiples factores como el genotipo, grado de actividad residual del defecto enzimático, metabolismo y farmacocinética del cortisol, por lo que debe ser individualizada para cada paciente. El objetivo es tratar con la mínima dosis eficaz que permita un equilibrio entre el crecimiento y desarrollo puberal normal, con una supresión adecuada de los andrógenos suprarrenales. La infradosificación podría dar lugar a una pubertad precoz con cierre prematuro de epífisis y talla baja en el adulto, virilización, desarrollo potencial de tumores hipofisarios, adrenales y gonadales, y aumento de la síntesis de hormonas sexuales de origen adrenal. El tratamiento excesivo con glucocorticoides da lugar a un síndrome de cushing, con enlentecimiento del crecimiento, adiposidad central y supresión de la síntesis de hormonas sexuales de origen central.

## **5.2. TRATAMIENTO CON MINERALCORTICOIDES**

Los pacientes con déficit de aldosterona precisan tratamiento con mineralocorticoides (9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona) a dosis de 0,05-0,2 mg/día. Esta dosis es independiente de la superficie corporal del paciente. Los lactantes necesitan dosis mayores de mineralcorticoides en los primeros meses de vida, generalmente 0,1-0,2 mg/día, mientras que los lactantes mayores y los niños se mantienen habitualmente con 0,05-0,1 mg/día de 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona.

Para favorecer el efecto mineralcorticoide se administran suplementos de cloruro sódico hasta que inicien la alimentación complementaria (con sal) (269).

### 5.3 TRATAMIENTO DE LA FORMA CLÁSICA

El objetivo del tratamiento de la forma clásica en el periodo neonatal tiene como objeto frenar la hipersecreción de ACTH y el hiperandrogenismo, y evitar y tratar si se presenta, las crisis de pérdida salina.

Para frenar la hipersecreción de ACTH suele ser necesaria la administración de hidrocortisona a dosis de 20 mg/m<sup>2</sup>/día dividida en tres dosis. El déficit de aldosterona está presente en cerca del 90% de los pacientes con forma clásica por lo que también precisan la administración de mineralcorticoides. La leche materna y las formulas infantiles tienen un bajo contenido en sodio ( $\approx$  8mEq/L) por lo que necesitan la administración de cloruro sódico (4-8 mEq/kg peso/día) para favorecer el efecto mineralcorticoide de la 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona.

Las crisis de pérdida salina pueden producirse ante cualquier situación clínica que implique un aumento de las necesidades de cortisol, como infecciones, situaciones de estrés e intervenciones quirúrgicas. Si se presenta el cuadro de pérdida salina debe reponerse la pérdida de líquidos y aumentar la dosis de glucocorticoides entre 2 y 10 veces la dosis de mantenimiento en función del grado de estrés. En las infecciones intercurrentes se recomienda doblar o triplicar la dosis de hidrocortisona durante los días que dure el proceso. Si existen vómitos o el estrés es intenso, los glucocorticoides deben administrarse por vía parenteral.

El objetivo del tratamiento de la forma clásica fuera del periodo neonatal tiene como objetivo frenar la hipersecreción de ACTH y el hiperandrogenismo, evitar la aparición de crisis de pérdida salina, permitir un adecuado crecimiento y desarrollo de la función gonadal, corregir quirúrgicamente las malformaciones de los genitales externos y realizar soporte psicológico.

La hipersecreción de ACTH y el hiperandrogenismo se frenan con la administración diaria de hidrocortisona oral a dosis de 12-15 mg/m<sup>2</sup>/día. La administración de 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona a dosis de 0,05-0,1 mg/día suele ser suficiente. Los suplementos de cloruro sódico se mantienen durante el primer año de vida, hasta la suplementación de la alimentación complementaria con sal.

La corrección quirúrgica de las malformaciones de los genitales externos dependerá el grado de virilización de las mismas. Se recomienda que se realice entre los 3 y los 6 meses de edad (270).

En la adolescencia y en la edad adulta es igualmente importante un tratamiento óptimo, aunque los problemas están más relacionados con la obesidad, las irregularidades menstruales, el hirsutismo, la posible infertilidad y la prevención de la osteoporosis (271). Los glucocorticoides pueden administrarse en una dosis única nocturna para frenar mejor el exceso de ACTH (268, 272) y se debe ir ajustando la dosis para mantener las concentraciones séricas de testosterona y androstenediona en el rango de la normalidad. La necesidad de tratamiento con 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona debe ser individualizada, ya que su empleo en las formas virilizantes simples puede dar lugar a hipertensión, mientras que a su vez permite disminuir la dosis de glucocorticoides, reduciendo la adiposidad abdominal y las complicaciones metabólicas asociadas. La dosis necesaria suele ser menor que en la infancia.

El exceso de andrógenos no causa síntomas relevantes en el varón adulto. En la mujer, se ha considerado tradicionalmente que la dosificación correcta de glucocorticoides era la medida idónea para el control de exceso androgénico, la realidad es que el acné y el hirsutismo rara vez alcanzan un control satisfactorio si no se utilizan otros fármacos con acción antiandrogénica.

#### **5.4 TRATAMIENTO DE LAS FORMAS NO CLÁSICAS**

Las indicaciones para iniciar tratamiento en un paciente con forma no clásica incluyen pacientes con síntomas importantes de hiperandrogenismo con una repercusión negativa sobre el crecimiento, maduración ósea o la función gonadal. Una adolescente puede tratarse si existen síntomas de hirsutismo, la oligomenorrea y acné severo. El tratamiento se realiza con hidrocortisona a dosis de 10-15 mg/m<sup>2</sup>/día, prednisona a 5 mg/día o dexametasona a dosis de 0,5-1,0 mg/día. La administración de un anovulatorio y un antiandrógeno puede estar indicada. El control efectivo del hirsutismo requiere tratamientos prolongados (hasta 30 meses) (273).

#### **5.5 OTROS TRATAMIENTOS**

Se ha propuesto como alternativa terapéutica al tratamiento clásico del déficit de 21-hidroxilasa, una pauta que incluye cuatro fármacos, con objeto de atenuar los

efectos adversos del exceso de andrógenos circulantes. Se ha propuesto una alternativa terapéutica con cuatro fármacos, dosis bajas de hidrocortisona (8 mg/m<sup>2</sup>/día), 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona a dosis habituales, asociados a un antiandrógeno bloqueante de los receptores androgénicos como la flutamida y un inhibidor de la aromataasa, que impide la conversión de andrógenos a estrógenos retardando el cierre prematuro de las epífisis (testolactona) (274, 275). También puede utilizarse hormona de crecimiento recombinante asociada o no a análogos de GnRH (276, 277).

Se ha sugerido la adrenalectomía bilateral como tratamiento en aquellos pacientes en los que es extremadamente difícil el control de la enfermedad con tratamiento médico. Este tratamiento induce una insuficiencia suprarrenal completa, por lo que está reservada para casos extremos (278).

## **5.6 SEGUIMIENTO EN LOS PACIENTES CON HSC**

Los parámetros de vigilancia incluyen datos clínicos: control estricto de peso, talla, edad ósea y velocidad de crecimiento, tensión arterial y desarrollo puberal, y parámetros hormonales: 17-OHP, testosterona,  $\delta$ 4-androstendiona, ACTH y renina. Analíticamente los iones y EAB deben ser normales, y no frenar la 17-OHP. La testosterona plasmática es útil para valorar la eficacia del tratamiento en niñas y niños prepuberales, debiéndose mantener en rango normal, así como la androstendiona, DHEAS y ARP.

## **5.7 TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO PRENATAL**

El objetivo es prevenir la virilización de los genitales femeninos afectados de HSC por déficit del 21-hidroxilasa, para evitar la necesidad de cirugía correctora después del nacimiento, y la asignación incorrecta de sexo (279).

El diagnóstico prenatal se plantea en el feto que presenta riesgo 1:4 (ambos progenitores portadores de mutaciones severas, uno de los progenitores está afecto o ya ha habido un miembro diagnosticado). Es necesario realizar el estudio completo, bioquímico y genético molecular antes de programar un embarazo en las familias con

caso índice afecto. El diagnóstico molecular es necesario para establecer la indicación de tratamiento.

El diagnóstico prenatal de déficit de 21-OH del feto puede hacerse en el primer trimestre del embarazo, mediante biopsia corial, realizando cariotipo y estudio genético molecular de las vellosidades. En el segundo trimestre puede realizarse un análisis del líquido amniótico, aunque es tarde para evitar los genitales ambiguos.

El tratamiento de la madre embarazada se realiza lo antes posible, en la semana 5-8 de gestación, ya que es el periodo de diferenciación de los genitales. El tratamiento con dexametasona a la madre obliga a un riguroso control debido a los efectos secundarios: Síndrome de Cushing con hipertensión arterial, sobrepeso, depresión y riesgo de infecciones. Se administra dexametasona 0.5 mg/8 horas (20 µg/kg/día con respecto al peso antes del embarazo). La dexametasona atraviesa la placenta y suprime la ACTH fetal. El estudio genético y el cariotipo indicarán si el tratamiento debe continuar (feto femenino y afecto) o debe ser interrumpido (feto varón o femenino y no afecto). En caso de mantener el tratamiento hasta el parto, la madre debe recibir tratamiento parenteral con hidrocortisona a dosis de estrés severo y reducir después gradualmente (279-282).

## **OBJETIVOS**

## **JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**

La glándula suprarrenal está formada por dos tejidos endocrinos de diferente origen embriológico: las células de la corteza productoras de esteroides procedentes del mesodermo, y las células cromafines productoras de catecolaminas procedentes de las células de la cresta neural (36).

Clásicamente se ha considerado que la corteza y la médula forman dos unidades endocrinas claramente diferenciadas y separadas. Sin embargo, estos dos sistemas están íntimamente relacionados, tanto ontogénica y anatómica, como funcionalmente, interactuando entre sí y regulando sus respectivas funciones (98, 110).

Las células de la glándula suprarrenal, tanto de la corteza como de la médula, se comunican unas con otras y se adaptan a la función de la glándula en diferentes situaciones. Varios mecanismos reguladores están localizados en la propia suprarrenal y varios componentes de la glándula contribuyen a estas funciones. La suprarrenal produce una amplia variedad de hormonas, neuropéptidos, neurotransmisores y citoquinas, y la localización de estos sistemas tiene gran importancia funcional. Este control integrado involucra: interacciones córtico-medulares, el aporte vascular y neural, el sistema inmune, factores de crecimiento, el sistema renina-angiotensina intraglandular y el sistema CRH-ACTH. Estos sistemas influyen unos en otros y forman complejos circuitos de regulación intraadrenal.

Esta íntima relación comienza ya desde la época fetal. Las células precursoras cromafines migran al primordio adrenal en la sexta semana de gestación e inician su diferenciación a células cromafines maduras bajo la influencia de los glucocorticoides. Son necesarias altas concentraciones de glucocorticoides intraadrenales para la inducción de feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), enzima que cataliza en paso de noradrenalina a adrenalina y la consiguiente síntesis de adrenalina en la médula adrenal. Esta enzima es fundamental para la síntesis de adrenalina tanto en la época fetal, como en el niño y en el adulto (77, 283). La aldosterona también estimula la síntesis de catecolaminas activando la enzima limitante de su síntesis, la tirosina hidroxilasa (79, 96). El andrógeno sintetizado en la corteza suprarrenal, DHEA, regula las células del sistema neuronal,

desarrollando un importante papel tanto en el crecimiento de la glándula, como en el proceso de diferenciación de las células cromafines (87-90).

A su vez, diferentes neuropéptidos producidos por las células cromafines como noradrenalina, adrenalina, dopamina, VIP, PACAP, PNA y vasopresina (107) regulan la liberación de las hormonas esteroideas activando la transcripción de RNAm de enzimas implicadas en la esteroidogénesis y la síntesis de hormonas de la corteza (104-106, 108).

Estas interacciones bidireccionales son especialmente importantes para el ajuste fino de la glándula y para la adaptación a situaciones de estrés o de enfermedad. La respuesta fisiológica al estrés da lugar a una serie de cambios a corto y largo plazo en prácticamente todos los sistemas que permiten que el organismo se adapte a una serie de estímulos tanto físicos como fisiológicos (195). La respuesta endocrina al estrés implica la activación y sincronización del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal y del sistema simpático-medular, produciendo un aumento de la secreción de hormonas suprarrenales, particularmente glucocorticoides en la corteza y adrenalina de la médula suprarrenal (77, 196).

Consecuentemente, alteraciones en la corteza suprarrenal pueden afectar a la función de las células cromafines y viceversa.

Pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa presentan una alteración en la síntesis de glucocorticoides, mineralcorticoides y andrógenos de forma global o parcial, dando lugar a un grupo heterogéneo de formas clínicas. Esta disminución en la esteroidogénesis puede alterar el desarrollo de la formación de la médula suprarrenal, la diferenciación de las células cromafines y la síntesis de adrenalina, noradrenalina y otros neuropéptidos, probablemente debido a un déficit de cortisol intraútero, efectos no conocidos de CYP21A2 o una combinación de factores.

En la práctica clínica observamos que algunos pacientes con las formas más graves de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa presentan numerosas descompensaciones en respuesta a una enfermedad febril u otra situación de estrés, a pesar de un adecuado tratamiento con glucocorticoides y mineralcorticoides y una buena adherencia al mismo. Acuden frecuentemente a centros hospitalarios precisando administración de fluidoterapia y glucocorticoides vía parenteral para su estabilización a pesar de haber duplicado en su domicilio la dosis de glucocorticoides.



Estos pacientes podrían tener un cierto grado de disfunción adrenomedular, con una alteración en la señalización, sincronización e interacción bidireccional del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal y simpático-medular, que los haría más susceptibles a descompensaciones ante situaciones de estrés o de enfermedad.

Esta disfunción adrenomedular se ha estudiado en ratones con déficit de 21-hidroxilasa (284). Existen pocos estudios que hayan evaluado la función medular en pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa, siendo todos ellos con escaso número de pacientes (285-288). Ninguno de ellos realiza una correlación entre la disfunción adrenomedular y las frecuentes crisis de descompensación observadas en la práctica clínica diaria.

Los objetivos de este trabajo son:

A.-OBJETIVOS PRIMARIOS:

1. Análisis de la **función adrenomedular** en pacientes diagnosticados de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa y la posible relación con las diferentes formas clínicas, con el genotipo y las crisis de descompensación.
2. Análisis comparativo de los pacientes con **fenotipo pierde sal** con y sin déficit de adrenalina, valorando sus características clínicas, analíticas y necesidades terapéuticas.
3. Posibles **efectos clínicos** del déficit adrenomedular en las crisis de descompensación.

B.-OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Establecer la **relación genotipo-fenotipo** en los pacientes con hiperplasia suprarrenal por déficit de 21-hidroxilasa.
2. Análisis de los **datos auxológicos** de los pacientes con hiperplasia suprarrenal en el momento del estudio: peso, talla e IMC.
3. **Descripción** clínica, analítica y tratamiento seguido de los pacientes en el momento del estudio.

## **PACIENTES Y MÉTODOS**

## I.- SELECCIÓN DE LOS PACIENTES PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

El estudio se realizó en la Sección de Metabolismo y Desarrollo/Endocrinología Pediátrica, unidad clínica, docente e investigadora del Departamento de Pediatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, centro de nivel terciario, perteneciente a la red hospitalaria de la Comunidad de Madrid, con vinculación docente con la Universidad Complutense de Madrid.

Realizamos un estudio transversal y descriptivo de noviembre de 2002 a marzo de 2008 a una serie de pacientes diagnosticados de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa seguidos en la sección.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

Se incluyeron en el estudio todos los pacientes diagnosticados de hiperplasia suprarrenal congénita por 21-OHD seguidos en nuestra sección del año 1983 a 2008.

El diagnóstico se realizó por distintos métodos:

#### **1. SOSPECHA CLINICA:**

Hasta el año 1990 los pacientes se diagnosticaban a partir de síntomas sugerentes de las diferentes expresiones clínicas de la enfermedad, confirmando mediante estudio bioquímico, tanto el metabolismo hidrosalino para el diagnóstico de las formas pierde sal, como el estudio hormonal específico.

#### **2. MEDIANTE EL PROGRAMA DE DETECCIÓN PRECOZ DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE MADRID:**

Desde el año 1990 el Hospital Gregorio Marañón es centro de referencia para la detección, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa (21-OHD). A todos los recién nacidos en la

Comunidad Autónoma de Madrid se realiza el cribado neonatal de esta enfermedad determinando la 17-OHP en una muestra de sangre capilar tomada a partir de 48 horas de vida, sobre la que se realiza también la detección precoz de hipotiroidismo, anemia falciforme y fibrosis quística. Las muestras se envían al laboratorio de Cribado Neonatal, del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Los valores de normalidad de 17-OHP dependen del peso y de la edad gestacional(247). Cuando los niveles de 17-OHP están por debajo del punto de corte establecido para edad gestacional, se considera no patológico. Si está en el límite alto, se realiza una nueva determinación de 17-OHP en la segunda muestra de talón que se toma a todos los recién nacidos a partir del 4º-5º día de vida para la detección de precoz de fenilcetonuria. Cuando los niveles de 17-OHP son patológicos se derivan a la Sección de Metabolismo y Desarrollo para confirmación diagnóstica.

Los valores de normalidad en el laboratorio de Cribado Neonatal y el procedimiento seguido, se exponen en las siguientes tablas:

**Tabla 6. Valores de normalidad establecidos de 17-OHP de la 1º muestra de sangre capilar.**

1º MUESTRA	VALORES DE NORMALIDAD DE 17-OHP (nmol/L)				
E.G (sem)	0-30	31-59	60-99	100-130	>130
≤33+0	negativo	negativo	negativo	negativo	2º muestra
33+1-35+0	negativo	negativo	negativo	2º muestra	consulta
35+1-36+0	negativo	negativo	2º muestra	consulta	consulta
≥36+1	negativo	2º muestra	consulta	consulta	consulta

**Tabla 7. Valores de normalidad establecidos de 17-OHP de la 2º muestra de sangre capilar.**

2º MUESTRA*	VALORES DE NORMALIDAD DE 17-OHP (nmol/L)			
E.G (sem)	0-30	31-59	60-99	100-130
≤33+0	negativo	negativo	negativo	consulta
33+1-35+0	negativo	negativo	consulta	consulta
35+1-36+0	negativo	consulta	consulta	consulta
≥36+1	negativo	consulta	consulta	consulta

EG: edad gestacional

\*2º muestra extraída:

≤ 33+0: 14-16 días tras la 1º muestra

>33+0: 7-9 días tras la 1º muestra

En la Sección de Metabolismo y Desarrollo se realiza la confirmación diagnóstica mediante:

**Anamnesis:** en la primera evaluación se recogen datos del embarazo, edad gestacional, parto, peso al nacimiento, periodo neonatal, medicaciones recibidas y existencia de alguna patología. Para reconocer la posible aparición de una crisis de pérdida salina se valora la ganancia ponderal, el tipo de alimentación (la lactancia materna puede retrasar unos días la aparición de la crisis de pérdida salina) y síntomas compatibles. Se recogen también los antecedentes familiares de talla baja, edad de aparición de menarquia, hirsutismo, ovarios poliquísticos en las mujeres, edad de aparición del estirón puberal en los hombres, abortos de repetición o muertes no bien diagnosticadas en los primeros meses de vida.

**Exploración física:** Se determina el peso y la longitud, comparando con los datos del nacimiento para estimar la pérdida ponderal. Se valora el grado de deshidratación, situación hemodinámica y genitales externos, prestando especial atención a la hiperpigmentación general, de mamilas y genitales.

**Analítica:** Se realiza una determinación de iones en sangre y orina (Na, K), un equilibrio ácido base y bioquímica para determinar la función renal. Los pacientes con datos compatibles con pérdida salina ( $\text{Na} < 130 \text{ mEq/L}$ ,  $\text{K} > 6.0 \text{ mEq/L}$ ) ingresan y reciben tratamiento hospitalario urgente. Las formas virilizantes también ingresan, ya que hasta el 75% de ellas pueden presentar un episodio de descompensación hidrosalina. Se extrae nuevamente 17-OHP en sangre venosa para confirmar el diagnóstico, cortisol, aldosterona, ARP y estudio genético molecular.

### 3. ESTUDIO FAMILIAR DE PACIENTES AFECTOS.

El 21-OHD es una enfermedad hereditaria autosómico recesiva con una alteración genética conocida. Cuando se establece el diagnóstico del paciente, se debe realizar estudio genético molecular al paciente y a su familia. De esta forma, aparte del caso índice se han diagnosticado formas más leves de la enfermedad en hermanos o se ha anticipado el diagnóstico prenatalmente.

Los pacientes fueron clasificados en 4 grupos según la expresión clínica de la enfermedad o el fenotipo (224, 262, 289-291):

➤ **Grupo A: HSC forma clásica pierde sal**

Pacientes diagnosticados por clínica sugestiva de 21-OHD con pérdida salina, confirmando el diagnóstico por niveles elevados de 17-OHP. A partir del año 1990 los pacientes se detectaron mediante el programa de detección precoz, anticipándose a la aparición de la crisis de pérdida salina.

La crisis de pérdida salina se caracteriza clínicamente por vómitos, decaimiento, deshidratación hiponatrémica e hiperpotasémica, con natriuresis elevada y shock hipovolémico. Analíticamente existe un déficit de cortisol, aldosterona y elevación de la actividad de renina plasmática con cociente ARP/aldosterona elevado.

Clínicamente se dividen en dos grupos: aquellos que presentan frecuentes descompensaciones clínicas a pesar de un adecuado tratamiento con glucocorticoides y mineralcorticoides y aquellos que ante las mismas situaciones estresantes y tratados de igual forma permanecen estables.

➤ **Grupo B: HSC forma clásica virilizante simple**

Son pacientes que han sido diagnosticados por el programa de screening o por clínica compatible: en el varón, macrogenitosomía o pubarquia precoz y en la niña, genitales ambiguos.

Ningún paciente ha presentado un episodio de pérdida salina.

➤ **Grupo C: HSC forma no clásica o tardía**

Son pacientes diagnosticados en su mayoría por clínica compatible. Menos frecuentemente se han diagnosticado por tener un hermano afecto o por el programa de detección precoz de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Esta forma se caracteriza clínicamente en la infancia, por pubarquia prematura, aceleración de la velocidad de crecimiento y de la edad ósea, acné y aumento del olor

apocrino. En la adolescencia las mujeres pueden presentar irregularidades menstruales, hirsutismo, caída del cabello, ovario poliquístico y acné.

➤ **Grupo D: HSC forma críptica**

Son pacientes diagnosticados de 21-OHD en el programa de detección precoz que están asintomáticos en el momento de realizar el estudio.

**CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- Pacientes diagnosticados de 21-OHD en los que no se pudo realizar la detección de catecolaminas en orina de 24 horas (lactantes que no controlan esfínteres). (N=3)
- Pacientes registrados con el diagnóstico 21-OHD por el programa de screening neonatal y perdidos en el seguimiento o dados de alta a la sección de endocrinología de adultos. (N=6)

**MUESTRA REAL (43 pacientes):**

- **Grupo A (N=21)** Pacientes diagnosticados de hiperplasia suprarrenal congénita por 21-OHD forma clásica pierde sal.
- **Grupo B (N=8)** Pacientes diagnosticados de hiperplasia suprarrenal congénita por 21-OHD forma virilizante simple
- **Grupo C (N=12)** Pacientes diagnosticados de hiperplasia suprarrenal congénita por 21-OHD forma no clásica tardía
- **Grupo D (N=2)** Pacientes diagnosticados de hiperplasia suprarrenal congénita por 21-OHD forma críptica.



## **II.-METODOLOGÍA**

### **1) ANTECEDENTES FAMILIARES**

Se recogieron las tallas de los padres, antecedentes familiares de 21-OHD, consanguinidad y abortos previos o recién nacidos fallecidos de causa desconocida.

### **2) DATOS PERINATALES**

- 1.-Embarazo y parto.
- 2.-Edad gestacional, peso y longitud al nacimiento y Z score del peso y la talla ajustado para la edad gestacional y sexo según las tablas de Delgado Beltrán (292, 293).
- 3.-Periodo neonatal, medicaciones recibidas y existencia de alguna patología.

### **3) DATOS CLÍNICOS AL DIAGNÓSTICO**

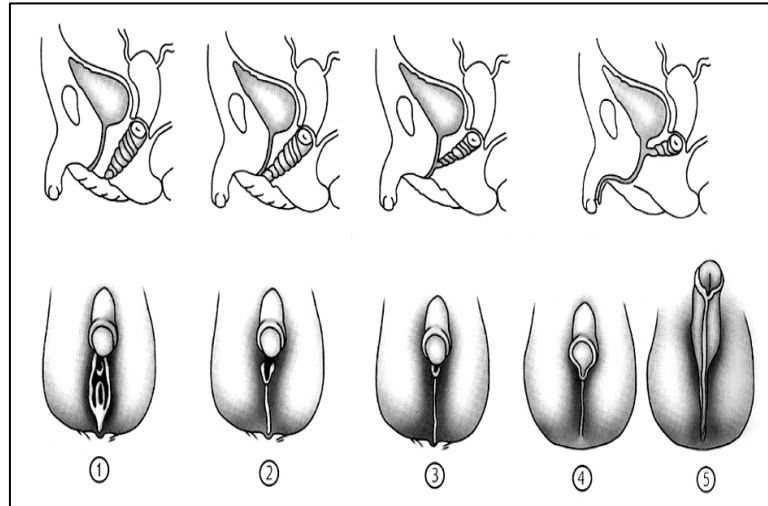
- 1.Edad de diagnóstico y de inicio de tratamiento.
- 2.Grado de virilización de genitales externos al diagnóstico:

#### **-Varones:**

- Grado I: No hiperandrogenismo
- Grado II: Hiperpigmentación de escroto y/o mamilas, macrogenitosomía

#### **-Mujeres:**

Para valorar el grado de virilización en las mujeres se utilizó los grados I-V según la clasificación de Prader (294):



### **Estadíos de Prader:**

**I:** genitales femeninos

**II:** hipertrofia de clítoris

**III:** hipertrofia de clítoris, fusión de labios mayores y seno urogenital único

**IV:** hipertrofia de clítoris con hipospadias perineal, fusión de labios mayores con apariencia escrotal

**V:** hipertrofia de clítoris con meato urinario en punta, apariencia completa de genitales masculinos.

### **3. Método de diagnóstico:**

- -Sospecha clínica + diagnóstico bioquímico
- -Screening neonatal
- -Estudio por tener un familiar afecto
- -Prenatal

### **4) DATOS ANALITICOS AL DIAGNÓSTICO**

- 17-OHP
  - En papel de filtro y en suero si se detectó por screening
  - En suero si fue por clínica compatible en el periodo perinatal
  - 17-OHP tras ACTH: se obtuvieron los valores de 17-OHP antes y a los 60 minutos de la inyección intravenosa de 250 µg de cosintropa

(Synacthen®) a los niños con clínica compatible en la infancia, adolescencia, o en el estudio de familiares afectos.

- Iones y glucemia en sangre en las formas clásicas

## **5) GENOTIPO**

En todos los pacientes se confirmó el diagnóstico mediante el estudio molecular del gen CYP21.

El efecto funcional de las mutaciones de CYP21 es el resultado de estudios que se han realizado in vitro. La mutación se introduce en el gen mediante mutagénesis dirigida, expresándose posteriormente y evaluando la actividad del enzima mutado frente a un control, que proviene de la expresión, también in Vitro, del gen normal.

De esta manera se ha definido como mutación grave del gen de la 21-OH aquella que deja una actividad residual de la actividad enzimática 21-OH del 0%. En este grupo se incluyen deleciones, conversiones grandes, mutaciones que dan lugar a que aparezca un codón de parada (Gln318Stop), inserción o deleción de base/s y el consiguiente desplazamiento de la fase de lectura con la partición del “stop” (deleción 8 pares de bases y 306InsT), mutaciones de cambio de aminoácido que se ubican en el dominio de centro activo (Arg356Trp y triple mutación del exón 6), que se asocian a las formas más graves de la enfermedad, las formas pierde sal (grupo 1). La alteración en el procesamiento del intrón 2 presenta una mínima actividad residual detectable de CYP21 (295) y se asocia fuertemente, aunque no completamente a las formas pierde sal (grupo 2). La mutación Ile172Asn es menos grave, con una actividad in Vitro menor al 10% y se asocia frecuentemente a la forma virilizante, sin alteraciones electrolíticas (grupo 3). Finalmente, en el grupo 4 están las mutaciones más leves, que muestran una actividad entre el 7-75% según las series. Estas mutaciones son: Val281Leu, Pro30Leu y Pro453Ser. La mutación Pro30Leu es considerada leve-severa ya que en ocasiones se presenta en formas virilizantes simple.

Los pacientes se pueden clasificar en cuatro grupos en función de su genotipo, que se relaciona directamente con el grado de actividad in Vitro de la enzima 21-hidroxilasa, como se ha descrito previamente en la literatura (262, 296, 297).

**Tabla 8. Mutaciones de CYP21 en función de la actividad enzimática (224, 265, 295).**

<b>Grupo</b>	<b>Actividad enzimática</b>	<b>Anomalías Gen CYP21A2</b>	<b>Localización</b>
1	<1%	<i>Delección de 8pb</i> <i>Ile-Val-Met/Asn-Glu-Lys</i> <i>Phe306 InsT</i> <i>Gln318Stop</i> <i>Arg356Trp</i> <i>Delección</i> <i>Conversión</i> Trp22Stop Pro30Glu Tyr47Δ1 Gln90Val 295 A-G Tyr97Stop Gly110Δ8 Cys168Δ1 Ile236Asp Val237Glu Met239Lys Gly291Ser Gly291Cys Trp302Stop Arg316Stop Arg354Hys Arg356Pro Trp405Stop Pro475Δ1 Arg483Δ1 Arg426Hys	Exón 3 Exón 6 Exón 7 Exón 8 Exón 8  Exón 1 Exón 1 Exón 1 Exón 2 Intrón 1 Intrón 2 Exón 3 Exón 4 Exón 6 Exón 6 Exón 6 Exón 6 Exón 7 Exón 7 Exón 7 Exón 7 Exón 8 Exón 8 Exón 8 Exón 8 Exón 9 Exón 10 Exón 10
2	Mínimamente detectable	<i>655A o C-G</i>	Intron 2
3	<10%  0-19%	<i>Ile172 Asn</i> Gly90Val Gly424Ser Gly178Ala	Exon 4 Exón 2 Exón 10 Exon 5
4	30-60% 20-50% 20-50% 60% 20-50% 30%	<i>Pro30Leu</i> <i>Val281Leu</i> <i>Pro453Ser</i> Pro105Leu Arg339Hys Glu380Asp Asp487Hys	Exon 1 Exon 7 Exon 10 Exón 3 Exón 8 Exón 9

## **6) NUMERO DE DESCOMPENSACIONES CLINICAS**

Se definió descompensación clínica como aquella situación de decaimiento, con mal estado general, mala perfusión periférica y palidez cutánea en respuesta a una enfermedad febril u otra situación de estrés a pesar de un adecuado tratamiento con glucocorticoides, mineralcorticoides y suplementos de cloruro sódico. Estas crisis pueden mantener electrolitos en sangre normales (286, 298, 299).

Tras el ingreso en el periodo neonatal, todos los pacientes se fueron de alta con un informe médico donde consta el diagnóstico, el tratamiento seguido, la dosis de hidrocortisona necesaria ante una situación de estrés y el teléfono de contacto de la Sección de Metabolismo y Desarrollo. También se instruyó a los padres la forma de aumentar la dosis de hidrocortisona en situaciones de estrés según la siguiente pauta:

-Estrés leve (febrícula): duplicar la dosis de hidrocortisona oral durante 2-3 días.

-Estrés moderado-severo (fiebre  $>38^{\circ}$ , cirugía, gastroenteritis...): administrar una dosis de hidrocortisona (Actocortina ®) intramuscular y acudir al centro hospitalario más cercano.

La aceptación y cumplimiento del tratamiento por parte de los familiares fue bueno, tienen revisiones periódicas (inicialmente cada 2-3 días, posteriormente semanales, espaciándose progresivamente hasta un máximo de revisiones trimensuales), y acceso libre al hospital, tanto a la urgencia, consulta como contacto telefónico.

El número de crisis adrenales están recogidas en la historia clínica, según informes médicos que aportan los familiares de asistencias a servicios de urgencias o ingresos hospitalarios en nuestro hospital o en otro centro.

Realizamos una revisión de los informes médicos de asistencias a urgencias en nuestro hospital (sistema informatizado a partir del año 2004) recogiendo los siguientes datos de los episodios relacionados:

- ☐ Motivo de consulta
- ☐ Tensión arterial
- ☐ Frecuencia cardíaca
- ☐ Temperatura
- ☐ Iones y glucemia

Se excluyeron las hospitalizaciones no relacionadas con la enfermedad.

## **7) DATOS AUXOLOGICOS, CLINICOS y TRATAMIENTO EN EL MOMENTO DEL ESTUDIO**

1. Edad en el momento de inicio del estudio.
2. Peso:
  - En menores de 10 kg: mediante báscula electrónica (Bascula Secca®), con un rango de lectura de 0.1 a 15 kg y una precisión de 10 gr. Se coloca al paciente en decúbito supino o en sedestación.
  - En mayores de 10 kg: mediante báscula electrónica (Bascula Secca®), con un rango de lectura de 0 a 120 kg y una precisión de 100 gr. Se coloca al paciente en bipedestación.
3. Longitud/Talla:
  - En menores de dos años, mediante tallímetro rígido no extensible en posición horizontal. La medición se realizó con dos exploradores. Se coloca al niño en decúbito supino sobre la tabla horizontal, y las rodillas y caderas en extensión. Un explorador sujeta la cabeza del niño al soporte y el otro explorador, con una mano extiende las rodillas del niño y con la otra desplaza el soporte móvil hasta ajustarlo a las plantas de los pies, efectuando entonces la lectura con un tope perpendicular a éstos. El rango de lectura es de 0 a 90 cm con una precisión de 0,5 cm.
  - En mayores de dos años, mediante tallímetro de Harpenden (Holtain Ltd., Crymmych, Pembrokeshire, Wales, UK), con el paciente en bipedestación. El rango de lectura es de 60 a 210 cm con un rango de precisión de 0,1 cm.

El peso y la talla se cuantificó en ropa interior, descalzos y sin calcetines en mayores de 2 años y desnudos en menores de 2 años.

4. *Z score deviation standard* para la talla y peso según la edad y sexo. Estudio transversal de crecimiento de la Fundación Faustino Orbegoza: Bilbao 2004 (300).
5. Estadío de desarrollo puberal según Tanner (301-303).
6. Edad ósea (Greulich & Pyle) (304).
7. Predicción de talla (método Bayley & Pinneau) (305).

8. *Z score desviation standard* del pronóstico de talla según el estudio transversal de crecimiento de la Fundación Faustino Orbegozo: Bilbao 2004 (300).

9. Talla diana familiar con la siguiente fórmula:

$$\blacksquare \text{ Talla diana niños} = \frac{(\text{talla padre} + \text{talla madre}) + 13}{2}$$

$$\blacksquare \text{ Talla diana niñas} = \frac{(\text{talla padre} + \text{talla madre}) - 13}{2}$$

10. *Z score desviation standard* de la talla diana familiar según el estudio transversal de crecimiento de la Fundación Faustino Orbegozo: Bilbao 2004 (300).

11. Presencia de signos de hiperandrogenismo:

El hirsutismo fue definido por la presencia de un exceso de vello corporal con distribución androgénica con una puntuación superior a 7 según la escala de Ferriman.Gallwey (306)

12. Tensión arterial:

Determinación de la tensión arterial no invasiva por el método oscilométrico mediante el aparato DINAMAP Procare 100. Aparato automático validado. Se colocó un manguito inflable adecuado al brazo de paciente, un 40% del ancho y un 80% de la circunferencia del brazo (307, 308) y se determinó la media de 2 mediciones de tensión arterial. Previo a la toma de tensión arterial el paciente permaneció sentado durante 5 minutos. Se definió hipertensión aquella tensión arterial sistólica y/o diastólica mayor al percentil 95 para la edad, sexo y talla (309).

13. Tratamiento:

▪ Hidrocortisona: tres veces al día en forma de comprimidos de 20 mg fraccionados (Hidroaltesona®) o cápsulas especialmente preparadas para cada paciente si la dosis administrada es menor a 5 mg. Dosis calculada en mg/m<sup>2</sup>/día. La superficie corporal se calculó según el nomograma de Crawford (310).

▪ 9α-fluorhidrocortisona: de una a tres veces al día administrada en forma de comprimidos fraccionados (Astonin®) o si la dosis es inferior a 0,025 mg en forma de cápsulas especialmente preparadas para cada paciente. Dosis calculada en mg/día.

▪ Cloruro sódico en forma de NaCl20% a los neonatos y lactantes que no han comenzado la alimentación complementaria. Se administra previo a cada toma.

## **8) DATOS ANALITICOS EN EL MOMENTO DEL ESTUDIO**

### **A) SANGRE**

Las extracciones sanguíneas fueron realizadas entre las 8.00 h y 9.00 h de la mañana tras un ayuno de 8-10 horas y previo a la toma de medicación de la mañana. A las mujeres que habían tenido la menarquia se realizó la extracción sanguínea en la fase folicular del ciclo menstrual (entre los días 3º y 10º).

La determinación de la actividad de renina plasmática (ARP) se realizó tras permanecer en reposo en decúbito supino 60 minutos antes de la extracción sanguínea.

#### **1.-Pacientes con formas clásicas (Grupo A+B: N=29):**

- 1) Analítica general: bioquímica sérica.
- 2) Analítica hormonal:
  1. Na y K en muestra venosa
  2. 17-OH-progesterona
  3. Cortisol basal
  4. ACTH
  5. Aldosterona
  6. ARP
  7. DHEA-S
  8. Testosterona
  9. Androstenediona

#### **2.-Pacientes con formas no clásicas (Grupo C+D: N=14):**

- 1) Analítica general: bioquímica sérica.
- 2) Analítica hormonal basal:
  1. 17-OH-progesterona
  2. Cortisol basal
  3. ACTH
  4. Aldosterona
  5. Testosterona



6. ARP
7. DHEA-S
8. Androstenediona

## **B) ORINA**

En orina se realizó una determinación de catecolaminas en 24 horas.

Durante la recogida de orina los pacientes permanecían en su domicilio y recibían su dosis habitual de gluco y mineralcorticoides.

Desde 3 días antes de la prueba se prohibió tomar café, te, chocolate, picantes, vainilla o colorantes, nueces, soda, plátano, piña, naranja y fármacos que puedan interferir en la interpretación de las catecolaminas en orina:

Entre los medicamentos que pueden aumentar las mediciones de catecolaminas se encuentran los siguientes: Acetaminofeno, aminofilina, hidrato de cloral, clonidina, disulfiram, eritromicina, insulina, levodopa, litio, metenamina, metildopa, ácido nicotínico (grandes dosis), nitroglicerina, quinidina, tetraciclinas.

Entre los medicamentos que pueden disminuir las mediciones de catecolaminas se encuentran las siguientes: clonidina, disulfiram, guanetidina, imipramina, inhibidores de monoaminoxidasa (IMAO), fenotiazinas, reserpina, salicilato.

El paciente recibe un recipiente con 10 mL de ácido clorhídrico 6M como conservante estabilizador. En su domicilio, recoge la orina de 24 horas en un contenedor limpio, al que va añadiendo el ácido clorhídrico (5 ml de ácido clorhídrico por cada litro de orina). De ahí se extraen 2 jeringas de 10 ml, que es lo que se envía a analizar (74, 311-314).

Se consideró disfunción adrenomedular cuando los valores de adrenalina, de noradrenalina y de dopamina en orina fueron  $\leq -2,5$  D.E. del rango de referencia para la edad o fuera del rango inferior de la normalidad en la edad adulta. Se consideró que los pacientes con valores  $> -2,5$  D.E. o en rango para la edad adulta no presentaban disfunción adrenomedular.

**Tabla 9. Valores de referencia de catecolaminas en orina (315).**

	<b>Adrenalina</b> <b>(µg/24h)</b>	<b>Noradrenalina</b> <b>(µg/24h)</b>	<b>Dopamina</b> <b>(µg/24h)</b>
<b>0-1 año*</b>	1,5 (1,0)	9,0 (4,6)	64,9 (31,5)
<b>1-3 años*</b>	2,0 (0,9)	8,1 (4,4)	84,5 (43,1)
<b>3-6 años*</b>	2,4 (0,4)	12,7 (4,7)	163 (56)
<b>6-10 años*</b>	4,1 (2,2)	20,5 (5,7)	200 (74)
<b>10-16 años*</b>	4,8 (1,6)	32,6 (6,9)	292 (56)
<b>Adultos**</b>	1,7-22,4	12,1-85,5	65-400

\*Expresado en media (desviación estándar)

\*\* Rango normal en la edad adulta

### III. TÉCNICAS DE LABORATORIO

#### **1. 17-OH-PROGESTERONA EN PAPEL DE FILTRO:**

A todos los recién nacidos en la Comunidad de Madrid, se les pincha con una lanceta estéril en uno de los laterales del talón y se deja formar una gran gota de sangre. Por aproximación a la superficie de la gota se impregnan los círculos marcados en el papel absorbente. Cada círculo debe impregnarse con una sola gota de sangre, así se asegura una distribución regular de los hematíes y del plasma en el soporte de papel. La gota de sangre debe traspasar al otro lado del papel absorbente. Se deja secar la tarjeta, en horizontal, a temperatura ambiente y se remite al laboratorio de referencia.. El procedimiento analítico utilizado para la medición de 17-OHP es un inmunoanálisis por fluorescencia a tiempo retardado (Auto Delfia, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Wallac Oy, Turku, Finland)). El coeficiente de variación inter e intra ensayo para 2 niveles de concentración (20-60  $\mu\text{mol/L}$  sangre) es de 3,2-2,8%, y 8,3 - 8,8 %, respectivamente.



**Ilustración 1. Ejemplo gráfico de la toma muestra**

#### **2. 17OH-PROGESTERONA VENOSA:**

La muestra se recogió en un tubo sin aditivo.

La determinación de 17-OH-Progesterona se realizó mediante radioinmunoanálisis (RIA) comercializado (INMUNOTECH S.A., Marseille Cedex,

France). El mismo equipo puede ser empleado para la medición de 17-OHP directamente, en suero o plasma, o indirectamente, después de la extracción de la muestra con éter y evaporación del solvente. Las muestras de suero o plasma, los extractos, el control y los calibradores se incuban con el trazador  $I^{125}$  17OHP en tubos recubiertos de anticuerpo. Después de la incubación, se aspira el contenido de los tubos y se determina la radioactividad enlazada. Los valores desconocidos se determinan mediante interpolación la curva estándar.

La sensibilidad analítica es de 0,046 ng/ml (0,14 nmol/L). La precisión intraanálisis tiene coeficiente de variación por debajo del 7,2% para el análisis directo o 7,8% para el análisis por extracción. La precisión inter-análisis tiene un coeficiente de variación inferior o igual al 5,6% para el método directo y del 15,7% para el método de extracción.

### **3. CORTISOL:**

La muestra se recogió en un tubo sin aditivo.

Se determinó mediante inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida comercializado (IMMULITE 2000 cortisol, Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA).

La sensibilidad de este análisis es de 0,20 µg/dl, la precisión intraanálisis tiene un coeficiente de variación para una concentración de 2,7 µr/dl del 4,9%, para una concentración de 22,1 µr/dl del 6,7% y para una concentración de 33,7 µr/dl del 5,3%. El coeficiente de variación interanálisis tiene un coeficiente de variación de 10,8%, 6,7% y 5,3% respectivamente.

### **4. ACTH**

La muestra se recogió en un tubo con EDTA y se guardó en hielo hasta que fue procesada.

Se determinó mediante un ensayo inmunoradiométrico comercializado (IRMA ACTH DiaSorin S.p.A. Saluggia, Italia). Se efectúa con dos anticuerpos de ACTH, cada uno de ellos específico para diferentes regiones de la molécula de ACTH. el trazador yodado utilizado en este sistema contiene un anticuerpo policlonal purificado de cabra específico para ACTH 26-39 y un anticuerpo monoclonal etiquetado con yodo

125 específico para ACTH 1-17. cuando las muestras se incuban con el trazador y los glóbulos de poliestireno recubiertos de anticuerpos de ratón anticabra., los anticuerpos específicos de ACTH se unen a la ACTH presente en la muestra. Sólo la ACTH 1-39 presente en la muestra se une a ambos anticuerpos para formar un complejo. La radiactividad libre es arrastrada y se mide la radiactividad unida al glóbulo. La concentración de ACTH presente en la muestra es directamente proporcional a la radiactividad medida. Los resultados se calculan comprando las cuentas por minuto de cada muestra con las cuentas por minuto de los calibradores ACTH incluidos en el equipo.

La sensibilidad de la técnica es de 1,5 pg/ml, la precisión intraanálisis tiene un coeficiente de variación para concentraciones de 8,6 pg/ml del 4,78%, para concentraciones de 10,39 pg/ml del 4,21% y para concentraciones de 260 pg/ml del 3,54%. La precisión interanálisis tiene un coeficiente de variación para concentraciones de 8,6 pg/ml del 5,74%, para concentraciones de 10,67 pg/ml del 4,94% y para concentraciones de 257,0 pg/ml del 3,16%.

## **5. ALDOSTERONA**

La muestra se recogió en un tubo sin aditivo.

Se determinó mediante un ensayo inmunoradiométrico comercializado (DiaSorin S.p.A. Saluggia, Italia). El principio del ensayo consiste en la competición entre la aldosterona marcada y la aldosterona contenida en los calibradores o en las muestras para el número fijo y limitado de sitios anticorpales. Después de la incubación, la cantidad de aldosterona marcada enlazada al anticuerpo fijado en los tubos recubiertos es inversamente proporcional a la concentración de aldosterona no marcada presente en los calibradores o en las muestras. El método adoptado para la separación libre / enlazado está basado en el empleo de los tubos recubiertos, en donde el anticuerpo está fijado a las paredes de los tubos.

La sensibilidad de la técnica es de 10 pg/ml. La precisión intraanálisis tiene un coeficiente de variación para concentraciones de 86,4 pg/ml del 5,3%, para concentraciones de 249,9 pg/ml del 3,8% y para concentraciones de 495,6 pg/ml del 1,7%. La precisión interanálisis tiene un coeficiente de variación para concentraciones de 91,3 pg/ml de 7%, para concentraciones de 230,3 pg/ml del 3,4% y para concentraciones de 607,5 pg/ml del 4,3%.

## **6. DHEA-S**

La muestra se recogió en un tubo sin aditivo.

Se determinó mediante inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida (IMMULITE 2000, Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA).

La sensibilidad de la técnica es de 3 µg/dl. La precisión intraanálisis tiene un coeficiente de variación para una concentración de 52,5 µg/dl del 9,8%, para una concentración de 163 µg/dl del 8%, para una concentración de 214 µg/dl del 6,5%, para una concentración de 521 µg/dl del 6,3% y para una concentración de 659 µg/dl del 4,9%. El coeficiente de variación interanálisis es de 13%, 9,8%, 9,3%, 8,8% y 7,9% respectivamente.

## **7. ACTIVIDAD DE RENINA PLASMÁTICA**

La muestra se recogió en dos tubos con EDTA. La muestra se guardó en hielo hasta que fue procesada.

Se determinó mediante el radioinmunoensayo competitivo comercializado (GAMMACOAT, DiaSorin S.p.A. Minnesota, USA). El procedimiento se basa en los principios de unión competitivos del radioinmunoensayo. En este ensayo se ha inmovilizado el anticuerpo en la pared inferior interna del tubo de GammaCoat. La determinación de la actividad de renina plasmática comprende la incubación inicial de plasma para generar angiotensina I, seguida de la cuantificación de angiotensina I mediante radioinmunoensayo.

La sensibilidad de la técnica es de 0,018 ng/tubo. La precisión intraanálisis tiene un coeficiente de variación para concentraciones de 1,6 ng/mL/h del 10%, para concentraciones de 6,2 ng/mL/h del 4,6% y para concentraciones de 17,9 ng/mL/h del 9,4%. La precisión interanálisis tiene un coeficiente de variación para concentraciones de 1,6 ng/mL/h del 5,6%, para concentraciones de 10,7 ng/mL/h del 7,6% y para concentraciones de 15,2 ng/mL/h del 6,8%.

## **8. TESTOSTERONA**

La muestra se recogió en un tubo sin aditivo.

Se determinó mediante un inmunoensayo competitivo que utiliza tecnología de quimioluminiscencia directa (ADVIA Centaur, Petaling Jaya, Salangor). La testosterona presente en la muestra del paciente compite con la testosterona marcada con éster de acridinio presente en el reactivo lumínico por una cantidad limitada de anticuerpo policlonal de conejo anti.testosterona, que está unido de forma covalente a partículas paramagnéticas de la fase sólida. El ensayo utiliza el agente liberador de testosterona para liberar la testosterona unida de las proteínas de unión endógenas de la muestra.

La técnica tiene una sensibilidad de 10 ng/dl. La precisión intraanálisis para una concentración de 95,5 ng/dl es del 6,2%, para una concentración de 365,4 ng/dl del 4,7%, para una concentración de 798,3 ng/dl del 2,6% y para una concentración de 1009,5 ng/dl del 2,3%. La precisión interanálisis es de 4,4%, 4,7%, 4,3% y 1,4% respectivamente.

## **9. ANDROSTENEDIONA**

La muestra se recogió en un tubo sin aditivo.

Se determinó mediante un ensayo radioinmunológico comercializado (GammaCoat™ DiaSorin, Stillwater, Minnesota). El procedimiento se basa en la competencia entre un antígeno radiactivo y uno no radiactivo por un número fijo de sitios de unión de anticuerpos. La cantidad de androstenediona etiquetada con  $I^{125}$  unida al anticuerpo en el tubo recubierto es inversamente proporcional a la concentración de androstenediona presente en el suero. La separación de antígeno libre y unido se logra mediante la decantación y aspiración de los tubos recubiertos de anticuerpo.

La técnica tiene una sensibilidad de 0,03 ng/dl. La precisión intraanálisis para una concentración de 0,85 ng/dl es del 6,4%, para una concentración de 3,14 ng/dl del 7,6% y para una concentración de 6,86 ng/dl del 6,7%. La precisión interanálisis para una concentración de 0,68 ng/dl es de 11,1%, para 2,17 ng/dl de 7,7% y para 7,03 ng/dl de 13,2%.

## **10. ADRENALINA, NORADRENALINA Y DOPAMINA**

Los recipientes con orina se guardaron en frío (-2-6°C) hasta que se llevaron al laboratorio.

El método utilizado fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: *high pressure liquid chromatography*) (BIO-RAD Laboratories GMBH, München, Germany). El procedimiento se basa en que al mezclar orina acidificada con un estándar interno y aplicarlo a una columna desechable de intercambio catiónico, las catecolaminas forman un complejo con los iones de borato y se eluyen selectivamente de la columna. Los compuestos se detectan gracias a su actividad electroquímica. La cuantificación se basa en la comparación de los ratios de alturas de picos en la muestra desconocida con el ratio correspondiente obtenido con un calibrador de orina.

La sensibilidad de la técnica para la detección de adrenalina es de 2,2 µgr/L, para la noradrenalina de 2 µgr/L y para la dopamina de 6,5 µgr/L.

Para la adrenalina, el coeficiente de variación intraensayo a una baja concentración (15,5 µgr/L) es de 4,8%, para una concentración media (51 µgr/L) es del 2 % y para una alta concentración (85,6 µgr/L) del 2,3 %. El coeficiente de variación interensayo es de 5,2%, 3,5% y 3,3% respectivamente.

Para la noradrenalina, el coeficiente de variación intraensayo a una baja concentración (47 µgr/L) es de 1,1%, para una concentración media (117,5 µgr/L) es del 1,4 % y para una alta concentración (188,3 µgr/L) del 2,4 %. El coeficiente de variación interensayo es de 3,2%, 2,7% y 2,8% respectivamente.

Para la dopamina, el coeficiente de variación intraensayo a una baja concentración (88,2 µgr/L) es del 4,1%, para una concentración media (281,3 µgr/L) es del 3 % y para una alta concentración (486,3 µgr/L) del 2 %. El coeficiente de variación interensayo es de 3,7%, 2,6% y 2,8% respectivamente.

## **11. IONES Y GLUCEMIA**

La muestra venosa o capilar se recogió en un tubo con heparina y se analizó en un cooxímetro/hematocrito/electrolito/glucosa/lactato: GEM Premier 4000 (Instrumentation Laboratory, Hartwell Ave., Lexington).

## **12. GENOTIPO** (263, 266, 296, 316)

La muestra se recogió en un tubo sin aditivo. Este análisis se realizó por 2 tipos de abordajes:



### **1.-Análisis directo del gen:**

Mediante southern blot y reacción en cadena de la polimerasa con hibridación específica de alelo. Esta técnica permite descartar el 95% de las mutaciones severas en la población española y un 85% de las mutaciones leves (265).

### **2.-Análisis indirecto del gen:**

Se ha realizado mediante marcadores polimorfos tipo microsatélite en la región HLA (D6S273, D6S439, y TAP1), para el despistaje de deleciones y mutaciones puntuales.

#### Métodos aplicados en el análisis molecular

Extracción de ADN de los leucocitos de sangre periférica de los pacientes y familiares con déficit de 21-hidroxilasa.

Detección de deleciones, conversiones grandes y duplicaciones en el CYP21A2 mediante digestión de ADN con los enzimas de restricción BglII, Taq I y Kpn I y análisis de los fragmentos de restricción mediante la técnica de Southern utilizando la sonda específica de CYP21A2, pC21/3c.

Densitometría óptica sobre las autorradiografías para la evaluación de la intensidad relativa de los fragmentos polimórficos asociados al gen y pseudogen.

Diseño y síntesis de los oligonucleótidos requeridos, tanto para la PCR, como para la hibridación específica de alelo.

Amplificación específica del gen CYP21A2 mediante la PCR, utilizando los oligonucleótidos descritos para las zonas diferenciales del gen y pseudogen.

Detección de 10 mutaciones puntuales por hibridación específica de alelo normal y mutado (ASO). Se incluirán las mutaciones descritas en formas clásicas: 655 A/C-G intrón 2, deleción de 8 pares de bases, Ile172Asn exón 4, Ile-Val-Glu-Lys23-239-Asn-Glu-Glu-Lys en exón 6, 306insT en exón 7, Gln318-Stop y Arg356Trp en exón 6 y tardías: Pro30Leu en exón 1, Val281Leu en exón 7 y Pro453Ser en exón 10. Para el marcaje de oligonucleótidos se empleará un marcaje no radioactivo con digoxigenina y revelado por quimioluminiscencia.

Análisis indirecto del gen mediante el estudio de los microsatélites D6S273, D6S439, y TAP1 en el complejo HLA en 5' y 3' del gen, así como un marcador adicional en 5'. También se ha utilizado un marcaje no radioactivo con fluorescencia

y análisis en cromatografía capilar (ABIPrism 310, Perkin Elmer) y análisis de fragmentos con programa GeneScan.

Electroforesis en geles nativos de ADN desnaturalizado para detección del polimorfismo de la cadena sencilla (SSCP) en fragmentos de 100-200pb. Se emplearán fragmentos amplificados y posteriormente digeridos con ER.

Tinción mediante método de Ag para aumentar la sensibilidad de esta técnica. Alternativamente se realizará marcaje radioactivo mediante incorporación del isótopo radioactivo.

Secuenciación de aquellos alelos candidatos a presentar mutaciones por método directo empleando polimerasa termoestable en termociclador y dideoxinucleótidos terminadores marcados con fluorescencia. Análisis mediante cromatografía capilar en ABIPrism310, Perkin Elmer.

El análisis molecular permite la caracterización de las mutaciones del gen de 21 hidroxilasa. El cribado básico de las 12 mutaciones recurrentes (224), 10 mutaciones puntuales, deleciones y conversiones alcanza una cobertura superior al 90% en las formas pierde sal, descartando el 99%.

## IV. ANALISIS ESTADÍSTICO

El estudio estadístico se realizó en la Unidad de Investigación del Servicio de Medicina Preventiva y Garantía de Calidad del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el programa estadístico SPSS, versión 12.0 para Windows.

Las variables cuantitativas se expresaron como media (desviación estándar) cuando cumplían criterios de una distribución normal, y en mediana (rango) cuando no los cumplían. Las variables cualitativas en forma de porcentajes.

Las pruebas paramétricas de contraste de hipótesis utilizadas fueron T-de Student para dos muestras independientes y ANOVA o análisis de la varianza para la comparación de medias entre dos o más grupos respectivamente.

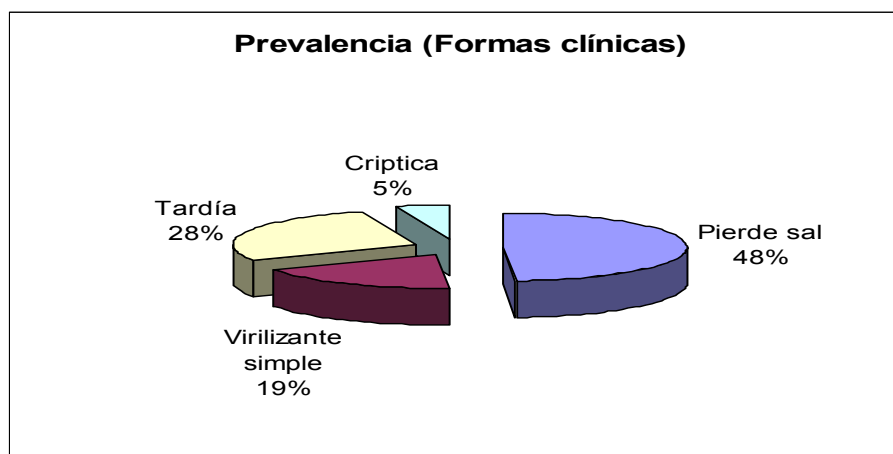
Las pruebas no paramétricas utilizadas fueron el Test de la U de Mann-Whitney para la comparación de medias de dos grupos independientes o el test de Kruskal-Wallis para la comparación de medianas cuando no se podía asumir la normalidad de la variable.

Para la comparación de variables cualitativas se utilizó el test se empleó el test Chi-cuadrado para el análisis de variables cualitativas, y el test exacto de Fisher para las variables cuantitativas cuando n era menor de 20 o cuando cualquier valor teórico era menor de 5. Los resultados se presentan como tablas de 2 x 2. En todos los análisis se estableció la significación estadística cuando  $P < 0,05$ .

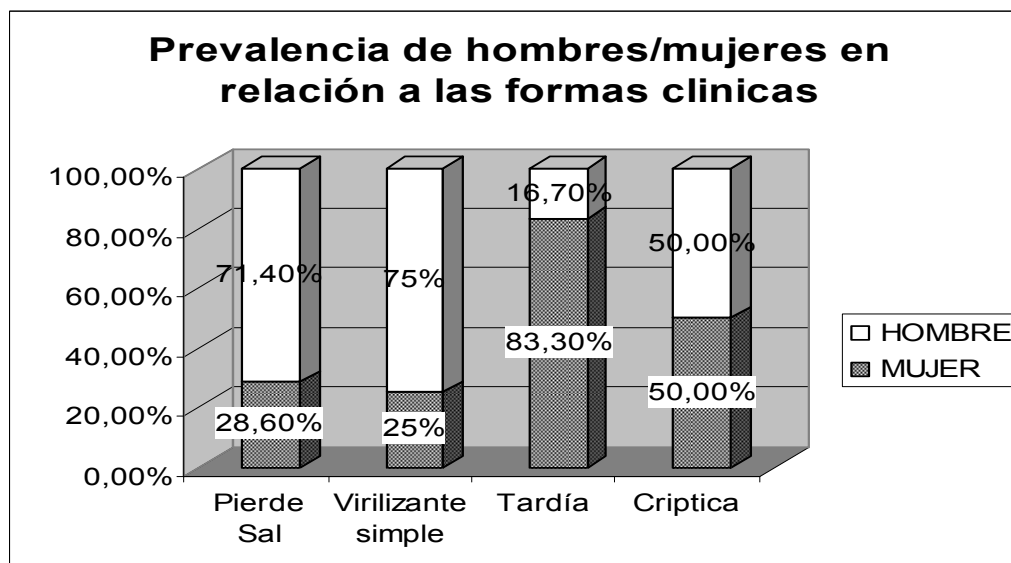
## **RESULTADOS**

# I. DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON HSC

Se incluyeron en el estudio cuarenta y tres pacientes con el diagnóstico de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa. De éstos, veintiuno (48,8%) eran formas clásicas pierde sal (Grupo A), ocho (18,6%) formas clásicas virilizantes simples (Grupo B), doce (27,9%) formas no clásicas tardías (Grupo C) y dos (4,6%) críptica (Grupo D).



Diecinueve (44,2%) de los pacientes son mujeres, mientras que veinticuatro (52%) hombres. La relación mujer/hombre en el grupo de la forma pierde sal fue 1:2,5, en la forma virilizante simple 1:3, en la forma tardía 1:5, y en la críptica 1:1.



## I.1. ANTECEDENTES FAMILIARES

Entre los antecedentes familiares de interés relacionados, en el grupo A (pierde sal) dos pacientes tenían un hermano afecto, otro paciente tenía 2 primos afectados de HSC y una paciente tuvo un hermano varón fallecido a los 21 días de vida por causa desconocida. En el grupo B (virilizante simple) dos tenían un hermano afecto de HSC, en el grupo C (tardía) tres un hermano afecto y 2 madres habían sido diagnosticadas de síndrome de ovario poliquístico (SOPQ). En el grupo D (críptica) no presentaban ningún antecedente de interés. Cuatro madres habían tenido un aborto previo en el grupo A y B, 3 en el grupo C y 2 en el grupo D.

**Tabla 10. Antecedentes familiares relacionados**

	<b>Hermanos afectos</b>	<b>Otros familiares afectados</b>	<b>Abortos previos</b>
<b>PS (N=21)</b>	2	2 primos con HSC 1 hermano varón fallecido en periodo neonatal	4
<b>VS (N=8)</b>	2	no	4
<b>NC (N=12)</b>	3	2 madres SOPQ	3
<b>C (N=2)</b>	no	no	2

PS: pierde sal; VS: virilizante simple; NC: no clásica; C: críptica  
SOPQ: síndrome de ovario poliquístico

## I.2 ANTECEDENTES PERSONALES

Se comparó la edad gestacional en cada uno de los grupos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p=0,56$ ). No se observaron diferencias en la longitud al nacimiento, en el *Z- Score desviación estándar* de longitud ni en el *Z- Score desviación estándar* de peso ( $p=0,84$ ,  $p=0,91$  y  $p=0,12$  respectivamente).

Sin embargo, el peso al nacimiento de la forma pierde sal fue mayor respecto a los niños de la forma virilizante simple ( $p=0,04$ ) y que las formas crípticas ( $p=0,042$ ). Las diferencias en el peso entre los niños con forma pierde sal y las formas no clásicas se aproximaron a la significación estadística ( $p=0,07$ ).

Los datos perinatales se exponen en la siguiente tabla:

**Tabla 11. Antecedentes personales**

	<b>PS (N=21)</b>	<b>VS (N=8)</b>	<b>NC (N=12)</b>	<b>C (N=2)</b>	<b>P</b>
<b>PRN (kg)</b>	3,52 (0,44)	3,12 (0,37)	3,21 (0,37)	2,8 (0,13)	0,03
<b>Z -PRN</b>	0,57 (1,07)	-0,04 (0, 8)	0,01 (0,96)	-0,86 (0,43)	0,12
<b>LRN (cm)</b>	50,89 (2,33)	50,37 (1,92)	50,16 (2,69)	51 (1,41)	0,84
<b>Z -LRN</b>	0,58 (1,28)	0,51 (1,09)	0,27 (1,56)	0,81 (1,45)	0,91
<b>EG (sem)</b>	39,24 (1,13)	38,5 (1,77)	38,8 (1,4)	38,5 (2,12)	0,56

Los valores están expresados en media (desviación estándar).

**PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica.

**PRN:** peso recién nacido; **Z-PRN:** *Z-Score desviación estándar* del peso al nacimiento.

**LRN:** longitud recién nacido; **Z-LRN:** *Z-Score desviación estándar* de la longitud al nacimiento. **EG:** edad gestacional.

### **I.3.- DATOS CLÍNICOS AL DIAGNOSTICO:**

La edad al diagnóstico en los pacientes con forma pierde sal fue significativamente menor que en aquellos con fenotipo virilizante simple ( $p=0,001$ ) y que en el resto de las formas ( $p<0,001$ ).

Los valores de 17-OHP (ng/ml) al diagnóstico también fueron significativamente mayores en los niños con forma pierde sal que en los virilizante simple ( $p=0,016$ ) y que en el resto de las formas ( $p<0,001$ ).

La virilización fue muy variable en las formas pierde sal: una niña presentó genitales externos femeninos normales (Prader I) por tratamiento prenatal a la madre gestante con dexametasona [1], otra niña con Prader III y otra con Prader V en la que se realizó una incorrecta asignación de sexo al nacimiento.

La edad de inicio de tratamiento en las **formas pierde sal** fue en el momento del diagnóstico. Se ingresaron en la unidad de neonatología y se inició tratamiento con sueroterapia, glucocorticoides y mineralcorticoides. La administración de glucocorticoides inicialmente fue intravenosa y tras la estabilización se pasó a tratamiento oral. Al alta, todos ellos recibían hidrocortisona oral (Hidroaltesona®)

repartida en 3 dosis, 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona oral (Astonin ®) y suplementos de cloruro sódico en cada toma en forma de cloruro sódico al 20%.

La virilización fue menor en las dos niñas con la **forma virilizante simple** que en las formas pierde sal, con un estadio de Prader II y III respectivamente. El tratamiento se inició al diagnóstico en todos los pacientes excepto en un varón, que había sido diagnosticado de HSC prenatalmente y una genética compatible con virilizante simple por tener un hermano afecto pero no acudió a la consulta hasta los 3 meses de edad. La mediana de edad de inicio de tratamiento fue de 45 días. Todos ellos fueron tratados ambulatoriamente con un estrecho seguimiento clínico con hidrocortisona oral (Hidroaltesona®), también repartida en 3 dosis, excepto en la paciente que estaba ingresada con genitales ambiguos (Prader III) en la que inicialmente se administraron los glucocorticoides i.v. Cinco de los ocho pacientes han precisado posteriormente tratamiento con mineralcorticoides, por aumento de la actividad renina plasmática, lo que indica una depleción crónica de sodio, sin haber presentado clínica de pérdida salina.

Las pacientes con **forma no clásica** no presentaron virilización de genitales (estadio de Prader I). El tratamiento con hidrocortisona oral (Hidroaltesona ®) se inició al diagnóstico en siete pacientes por signos precoces de hiperandrogenismo, aceleración de la velocidad de crecimiento y maduración ósea, mientras que el inicio del tratamiento se retrasó en cinco porque habían sido diagnosticados por screening o en el estudio familiar de niños afectados de HSC y estaban asintomáticos.

Los pacientes con la **forma críptica** estaban asintomáticos al diagnóstico y en el momento del estudio, por lo que ninguno ha precisado tratamiento.

Los datos clínicos al diagnóstico se exponen en la siguiente tabla:



**Tabla 12. Datos analíticos al diagnóstico.**

	<b>PS</b> <b>(N=21)</b>	<b>VS</b> <b>(N=8)</b>	<b>NC</b> <b>(N=12)</b>	<b>C</b> <b>(N=2)</b>	<b>P</b>
<b>Niño</b>	15	6	2	1	-
<b>Niña</b>	6	2	10	1	-
<b>Edad 1º consulta</b>	12,1 (10,7) días	27,6 (15,1) días	6,84 (1,84) años	39,5 (7,7) días	$<0,001$
<b>17-OHP (ng/ml)</b>	401,8 (291)	182,3 (66,4)	14,4 (3,83)	78,5 (27,5)	$<0,001$
<b>Estadío de Prader</b>	I-V	II-III	I	I	-
<b>Edad de inicio de tratamiento</b>	12,1 (10,7) días	117,9 (52,2) días	7,59 (1,9) años	-	$<0,001$

Los valores están expresados en media (desviación estándar).

PS: pierde sal; VS: virilizante simple; NC: no clásica; C: críptica.

#### **I.4.-METODO DE DIAGNÓSTICO**

##### **1) SOSPECHA DIAGNÓSTICA (N=14):**

a. Periodo neonatal (N=6): Cinco varones y una niña. Los cinco varones cursaron con un cuadro de vómitos, anorexia, escasa ganancia ponderal y deshidratación, mientras que las dos niñas fueron diagnosticadas por presentar genitales ambiguos. Cuatro de ellos nacieron en la Comunidad Autónoma de Madrid antes de la instauración del programa de detección precoz, y otro fue diagnosticado en Cuba y otro en una comunidad autónoma donde no se realiza screening.

b. Fuera del periodo neonatal (N=8): Las ocho niñas fueron diagnosticadas por adrenarquia precoz con aceleración de velocidad de crecimiento y de la edad ósea.

La siguiente tabla muestra el diagnóstico definitivo, sexo, la edad al diagnóstico, los valores de 17-OHP (ng/ml), sodio (mmol/L), potasio (mmol/L) y glucemia (mg/dl) en sangre de los pacientes diagnosticados por clínica compatible.

**Tabla 13. Pacientes diagnosticados por clínica compatible: sexo, edad, 17-OHP, iones y glucemia al diagnóstico.**

	<b>PS</b> (N=5)	<b>VS</b> (N=1)	<b>NC</b> (N=8)	<b>C</b> (N=0)	<b>P</b>
<b>Niño</b>	3	1	8	0	-
<b>Niña</b>	2	0	0	0	-
<b>Edad diagnóstico</b>	27,8 (15,15) días	§	7,46 (1,01) años	-	<0,001
<b>17-OHP (ng/dL)</b>	403,5 (263,7)	§	14,01 (10,24)	-	<0,001
<b>Na (mmol/L)</b>	121,33 (5,13)	§	-	-	-
<b>K (mmol/L)</b>	8,7 (0,95)	§	-	-	-
<b>Glucemia (mg/dl)</b>	76,25 (14,88)	§	-	-	-

**PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica.

Datos expresados en media (desviación estándar).

§ Datos desconocidos (procedente de otro hospital)

## 2) DETECCIÓN PRECOZ (N=24):

Desde que se puso en marcha el Plan de detección precoz de Hiperplasia Suprarrenal en 1990 en la Comunidad Autónoma de Madrid hasta marzo de 2008, se han analizado las muestras de 1.050.985 recién nacidos, de los cuales, 101 tenían elevadas las cifras de 17-OHP en la muestra de sangre capilar realizada al 2º día de vida. De éstos, 78 fueron remitidos al Hospital General Universitario Gregorio Marañón, siendo 33 diagnosticados de HSC y 45 de elevación transitoria de 17-OHP. Finalmente, 24 participaron en el estudio. Se excluyeron 9 pacientes porque habían sido ya remitidos a las consultas de Endocrinología de adultos (N=6) o porque no controlaban esfínteres y ser difícil la recogida de orina de 24 horas de forma ambulatoria (N=3).

En el momento de la llamada telefónica a la familia para comunicar el aumento de los niveles de 17-OHP, 19 de los 24 niños se encontraban en su domicilio. Dos niñas estaban hospitalizadas por presentar genitales ambiguos, otros 2 habían ingresado en otro centro hospitalario por un cuadro de vómitos y deshidratación, sin haberse sospechado HSC y otra niña estaba ya ingresada en nuestra unidad de neonatología con diagnóstico y tratamiento prenatal de HSC por déficit de 21-hidroxilasa. En una de las niñas que estaba en su domicilio se había realizado una incorrecta asignación de sexo.

Los niños con la forma clínica pierde sal se diagnosticaron antes que el resto de los niños con otras formas clínicas. La natremia fue significativamente menor en aquellos con fenotipo pierde sal comparado con aquellos con fenotipo virilizante simple ( $p=0,035$ ) pero no con las formas tardías ( $p=0,1$ ) ni con las formas crípticas ( $p=0,06$ ). La kaliemia es significativamente mayor en las formas pierde sal comparado con la virilizante simple, no clásicas y críptica ( $p=0,003$ ,  $0,005$  y  $0,035$  respectivamente). No se observaron diferencias en la glucemia al diagnóstico ( $p=0,6$ ).

Los valores de 17-OHP no discriminan las diferentes formas clínicas ( $p=0,1$ ), aunque los niños con el fenotipo pierde sal tenían niveles mayores de 17-OHP que el resto de las formas clínicas.

La siguiente tabla muestra el diagnóstico definitivo de los pacientes diagnosticados por screening, el sexo, la edad al diagnóstico, los valores de 17-OHP (nmol/L) de la muestra de talón, y los iones y glucemia en la primera visita para la confirmación diagnóstica.

**Tabla 14. Pacientes detectados por screening neonatal: sexo, edad, 17-OHP, iones y glucemia al diagnóstico.**

	<b>PS</b> <b>(N=16)</b>	<b>VS</b> <b>(N=5)</b>	<b>NC</b> <b>(N=1)</b>	<b>C</b> <b>(N=2)</b>	<b>P</b>
<b>Niño</b>	12	4	1	1	-
<b>Niña</b>	4	1	0	1	-
<b>Edad diagnóstico</b> <b>(días)*</b>	8 (7,5-14)	18 (12-24)	8	39,5 (34-45)	0,04
<b>17-OHP (nmol/L)*</b>	440 (153-665)	300 (220-320)	86	81 (35-127)	0,1
<b>Na (mmol/L) ‡</b>	126,16 (7,99)	132,4 (1,34)	145	137,1 (1,41)	0,024
<b>K (mmol/L) ‡</b>	6,78 (1,04)	5,32 (0,45)	5,5	5,2 (0,42)	0,015
<b>Glucemia (mg/dl) ‡</b>	76,25 (14,88)	82,2 (4,8)	86	86 (1,41)	0,6

**PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica.

\* Expresado en mediana (P25-P75)

‡ Expresado en media (desviación estándar)

### 3) ANTECEDENTES FAMILIARES (N=6)

Se realizó estudio analítico y molecular a los familiares directos del caso índice, detectándose formas asintomáticas o no diagnosticadas en padres y/o hermanos.

El diagnóstico y tratamiento prenatal se planteó en 2 familias cuyos padres eran portadores de mutaciones severas y ya tenían un hijo afecto [1]. El diagnóstico prenatal de la deficiencia 21-OH del feto con riesgo se realizó en el primer trimestre de gestación mediante biopsia de las vellosidades coriónicas y estudio de genética molecular, tras determinación del cariotipo, ya que sólo si el feto afectado es femenino hay indicación de continuar el tratamiento médico [2-4].

El tratamiento de la madre embarazada se realizó en la semana 5-8 de gestación. Se inició tratamiento con dexametasona oral a dosis de 20 µg/kg/día con respecto al peso antes del embarazo [5-7]. En la novena semana de gestación se realizó una biopsia corial: siendo en un caso el cariotipo 46 XY, y en otro cariotipo

46XX, ambos con genética compatible de HSC forma clásica. Se interrumpió el tratamiento en el primero, continuándose en el segundo [1].

La siguiente tabla muestra el diagnóstico definitivo, la edad al diagnóstico en media (D.E) y mediana, y los valores de 17-OHP (ng/dl) en sangre (D.E) y mediana de los pacientes diagnosticados por ser hermanos de niños afectados de HSC.

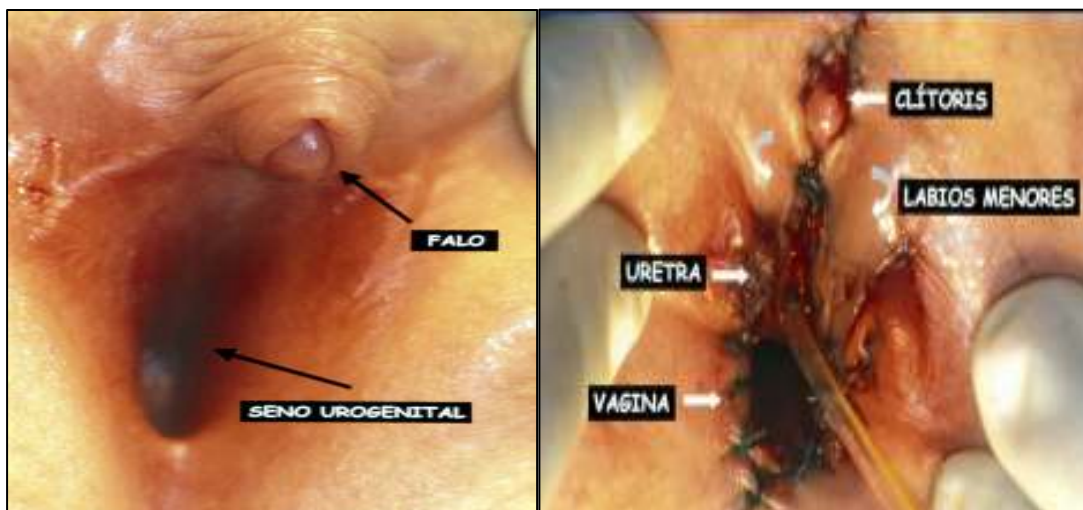
**Tabla 15. Pacientes diagnosticados por ser hermanos afectados de niños con HSC: edad y 17-OHP al diagnóstico**

	<b>PS</b> <b>(N=1)</b>	<b>VS</b> <b>(N=2)</b>	<b>NC</b> <b>(N=3)</b>	<b>C</b> <b>(N=0)</b>	<b>P</b>
<b>Niño</b>	0	1	2	0	-
<b>Niña</b>	1	1	1	0	-
<b>Edad diagnóstico</b>	Prenatal	39 (8,5) días	8,5 (2,02) años	-	$<0,001$
<b>17-OHP (ng/dL)</b>	586	130,5 (40,3)	3,6 (0,77)	-	$<0,001$

**PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica.  
Datos expresados en media (desviación estándar)

En todas las niñas con genitales virilizados se realizó reconstrucción quirúrgica de genitales a la edad de 10-12 meses: 5 pacientes con la forma pierde sal y 2 virilizante simple.

La cirugía consiste en clitoridectomía parcial en estadíos Prader II-III y clitoridoplastia, vaginoplastia y plastia de los labios mayores en las formas más virilizadas (Prader IV-V). Para la clitoridectomía parcial se utilizó la técnica de Spence y Allen, en la que se extirpa la mayor parte de los cuerpos cavernosos preservando la vascularización y la inervación del glande. La vaginoplastia se realizó por diferentes técnicas en función de su desembocadura y del año de realización. Cuando la vagina desemboca en un punto elevado pero por debajo del esfínter externo, se realizó un descenso del seno urogenital, mientras que si desemboca por encima del esfínter externo se realizó la técnica de Hendren antes del año 1988 precisando cirugías correctoras posteriores y la técnica de Peña modificada en las niñas posteriores a este año.



**Ilustración 2:** Clitoridoplastia, vaginoplastia y plastia de los labios mayores en un mismo acto quirúrgico (técnica de Peña modificada).



**Ilustración 3:** Genitografía; útero y trompas de falopio

### **I.5 DATOS AUXOLÓGICOS EN EL MOMENTO DEL ESTUDIO**

Los datos auxológicos, edad y tensión arterial de todos los pacientes en el momento del estudio se exponen en la tabla 7.

Se realizaron comparaciones de la edad en el momento del estudio, *Z- Score desviación estándar* de peso, talla, índice de masa corporal, talla diana y pronóstico de talla entre cada uno de los grupos (pierde sal, virilizante simple, no clásica y tardía).

La media de edad en el momento del estudio fue de 8,42 años (5,42 D.E), no existiendo diferencias entre los grupos ( $p=0,9$ ). No se observaron diferencias en la tensión arterial sistólica ( $p=0,39$ ) ni diastólica ( $p=0,73$ ) entre los diferentes grupos. Tampoco se observaron diferencias en el *Z- Score desviación estándar* de peso e índice de masa corporal ni *Z- Score desviación estándar* de la talla diana entre cada uno de los grupos ( $p=0,29$ ,  $p=0,5$  y  $p=0,22$  respectivamente).

Se observaron diferencias en el *Z- Score desviación estándar* de talla, siendo significativamente mayor en los pacientes con forma no clásica que en aquellos con el fenotipo pierde sal y virilizante simple ( $p=0,004$  y  $p=0,05$ ).

Se realizó el pronóstico de talla, el *Z- Score desviación estándar* del pronóstico de talla y las diferencias del *Z- Score desviación estándar* de pronóstico de talla y el *Z- Score desviación estándar* de su talla diana en aquellos pacientes con edad ósea mayor de 6 años (PS=12, VS=3, NC=11, C=2). El *Z- Score desviación estándar* del pronóstico de talla se aproximó a la significación estadística ( $p=0,06$ ), observándose diferencias entre el *Z- Score desviación estándar* del pronóstico de talla entre los pacientes con fenotipo pierde sal y las formas no clásicas ( $p=0,01$ ).

No se observaron diferencias entre el *Z- Score desviación estándar* de pronóstico de talla y el *Z- Score desviación estándar* de su talla diana ( $p=0,11$ ).

**Tabla 16. Datos auxológicos, edad y tensión arterial en el momento del estudio.**

	<b>PS (N=21)</b>	<b>VS (N=12)</b>	<b>NC (N=8)</b>	<b>C (N=2)</b>	<b>P</b>
<b>Edad (años)</b>	8,94 (6,74)	7,68 (6,08)	9,61 (2,17)	8,9 (0,08)	0,9
<b>TAs (mmHg)</b>	109 (15,25)	94,14 (9,08)	103,8 (18,08)	113,8	0,39
<b>TAd (mmHg)</b>	62,4 (11,6)	57,85 (7,28)	64 (9,29)	57	0,73
<b>Peso (kg)</b>	34,85 (22,79)	28,61 (16,14)	38,1 (12,45)	26,6 (0,7)	0,97
<b>Z - peso</b>	-0,01 (1,08)	0,1 (0,63)	0,42 (1,16)	-1,01 (0,13)	0,29
<b>IMC (kg/m2)</b>	19,22 (4,3)	18,85 (2,11)	19,13 (4,07)	15,51 (0,59)	0,65
<b>Z -IMC</b>	0,43 (1,38)	0,75 (0,87)	0,39 (1,52)	-1,06 (0,25)	0,5
<b>Talla (cm)</b>	125,7 (29,78)	118,4 (28,01)	142,5 (15,32)	133,1 (7,14)	0,4
<b>Z - talla</b>	-0,51 (0,62)	-0,62 (1,1)	0,33 (0,96)	-0,57 (0,6)	0,03
<b>Z-talla para la EO</b>	0,46 (1,09)	-1,01 (0,99)	-0,72 (0,81)	0,12 (1,71)	0,05
<b>Talla diana (cm)</b>	172,1 (9,16)	171,9 (6,6)	162,6 (6,88)	170,2 (10,56)	0,4
<b>Z - talla diana</b>	-0,05 (1,06)	-0,44 (1,0)	-0,53 (1,01)	0,04 (0,29)	0,22
<b>Pronóstico talla*</b>	173,2 (8,26)	170,3 (16,16)	159,6 (7,14)	168,1 (18,94)	0,03
<b>Z- Pronostico talla*</b>	0,3 (0,81)	0,09 (1,61)	-0,81 (0,9)	-0,27 (1,69)	0,06
<b>Zpronóstico de talla - Ztalla diana*</b>	0,52 (0,57)	0,62 (1,65)	-0,27 (1,19)	-0,31 (1,4)	0,11

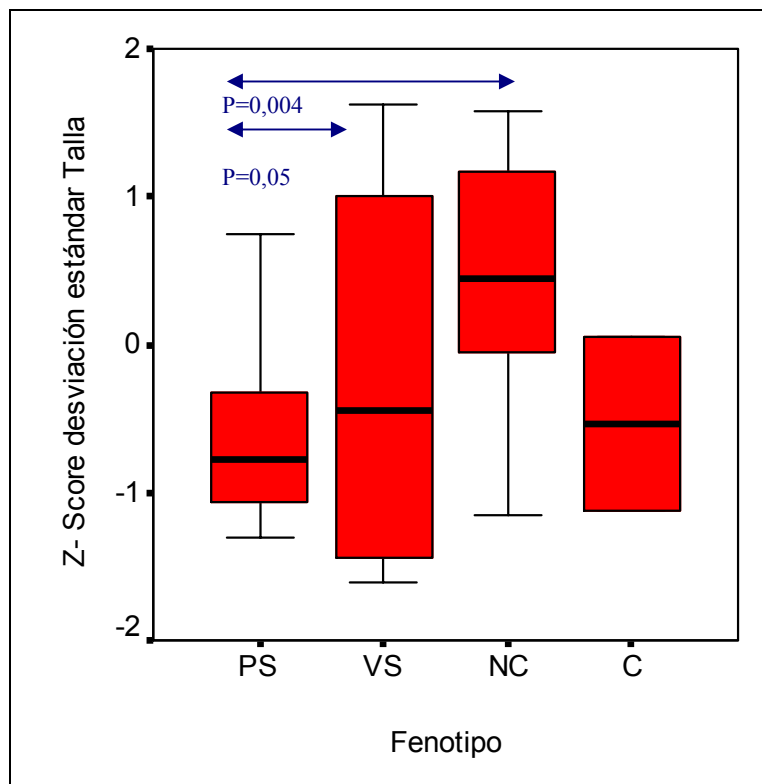
PS: pierde sal; VS: virilizante simple; NC: no clásica; C: críptica.

**Z-peso:** Z-Score desviación estándar del peso; **IMC:** índice de masa corporal; **Z-IMC:** Z-Score desviación estándar del índice de masa corporal; **Z-talla:** Z-Score desviación estándar de la talla; **Z-talla para la EO:** Z-Score desviación estándar de la talla para la edad ósea; **Z-talla diana:** Z-Score desviación estándar de la talla diana; **Z-pronóstico de talla:** Z-Score desviación estándar del pronóstico de talla; **Zpronóstico de talla-Ztalla diana:** Z-Score desviación estándar del pronóstico de talla- Z-Score desviación estándar de la talla diana.

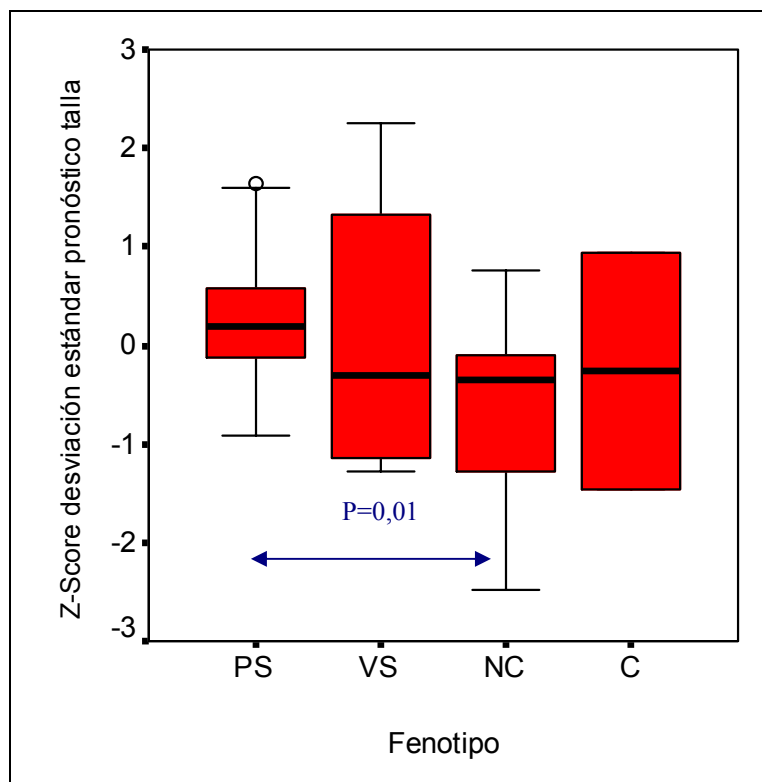
\* Realizado en pacientes con edad ósea >6 años (N: PS=12; VS=3; NC=11; C=2)

Datos expresados en media (desviación estándar).





**Grafica 1:** Z-score desviación estándar de la talla en relación a las diferentes formas clínicas: **PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica.



**Grafica 2:** Z-score desviación estándar del pronóstico de talla en relación a las diferentes formas clínicas: **PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica.

## **I.6. DATOS ANALÍTICOS Y TRATAMIENTO EN EL MOMENTO DEL ESTUDIO**

Los datos analíticos en el momento del estudio se exponen en la tabla 8.

Se realizaron comparaciones de la dosis de hidrocortisona (mg/m<sup>2</sup>/día), de 9 $\alpha$ hidrocortisona (mg/día), y valores de 17-OHP, ACTH, cortisol, androstenediona, aldosterona, actividad de renina plasmática (ARP) y testosterona entre los pacientes de las cuatro formas clínicas.

El cortisol basal fue significativamente menor en el grupo pierde sal que en el virilizante simple y que en el resto de las formas clínicas ( $p=0,02$  y  $p<0,001$ ), mientras que los valores de 17-OHP fueron también menores en los pacientes pierde sal respecto a las formas virilizante simple y tardía ( $p=0,003$  y  $0,04$  respectivamente). Los pacientes con fenotipo virilizante simple tenían unos niveles de 17-OHP significativamente mayor que las formas tardías ( $p=0,01$ ).

No se observaron diferencias en el resto de los valores

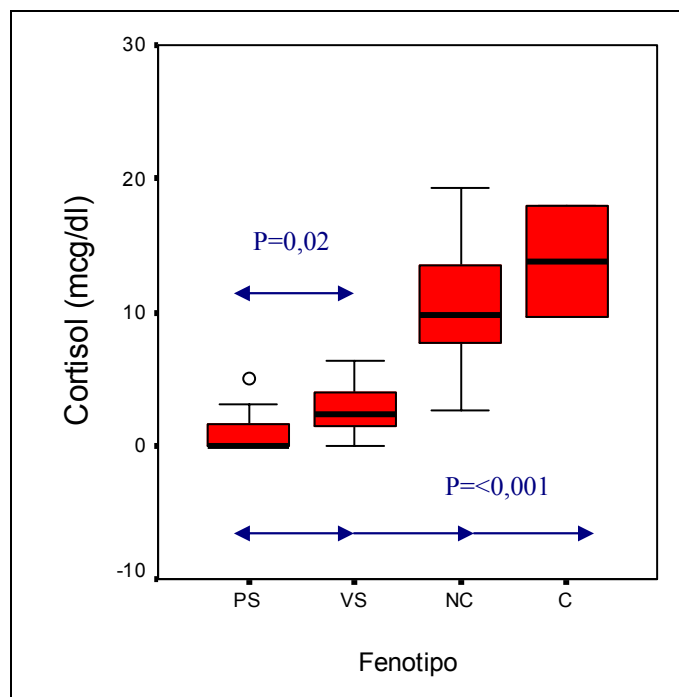
La dosis de hidrocortisona administrada a los pacientes con forma no clásica pierde sal fue significativamente menor que la administrada a los pacientes con formas clásicas ( $p<0,001$ ). No se observaron diferencias en la dosis de hidrocortisona que recibían los pacientes con la forma pierde sal respecto a los pacientes con forma virilizante simple ( $p=0,5$ ).

La dosis administrada de 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona en los pacientes con fenotipo virilizante simple por elevación de la actividad de renina plasmática es menor que en los pacientes con fenotipo pierde sal.

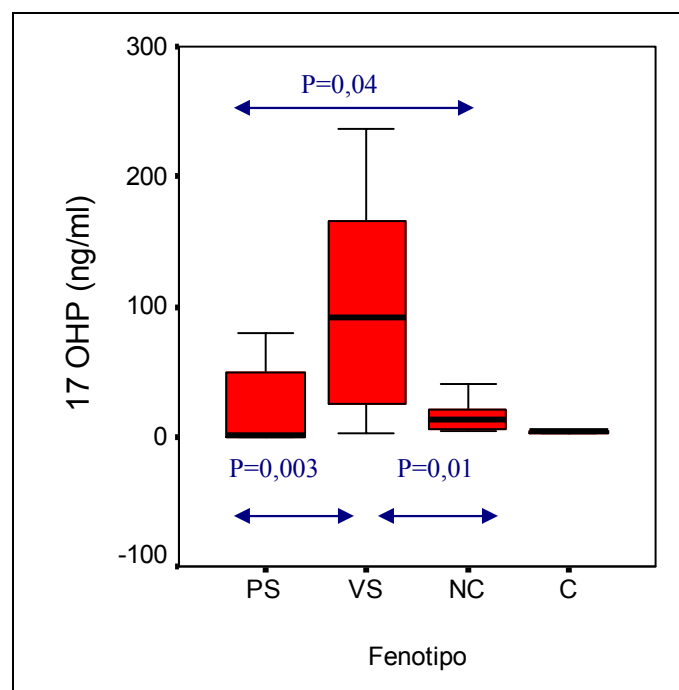
**Tabla 17. Datos analíticos en el momento del estudio.**

	<b>PS</b> (N=21)	<b>VS</b> (N=12)	<b>NC</b> (N=8)	<b>C</b> (N=2)	<b>P</b>
<b>17OHP</b> (N: 0,1-1,5 ng/ml)	0,6 (0,1-49,5)	91,5 (22,4- 194,5)	13,2 (4,4-20,7)	3,45 (3,1-3,45)	0,02
<b>ACTH</b> (N: 10-50 pg/ml)	61 (31,6- 135,5)	51,4 (29,4-81,5)	47 (29-62)	49,4 (22,3- 49,4)	0,6
<b>Cortisol</b> (N: 5-25 µg/dl)	0 (0-2,07)	2,4 (1,2-4,4)	9,7 (7,5-13,6)	13,85 (9,7-13,85)	<0,001
<b>Androstenediona</b> (N: 0,4-3,5 ng/ml)	0,1 (0-2,6)	2,2 (0,5-3,6)	1,6 (0,3-3,3)	0,4 (0,2-0,4)	0,13
<b>Aldosterona</b> (N: 10-150 pg/ml)	50 (50-81,5)	105 (50-257,9)	83,8 (57-286)	-	0,09
<b>ARP</b> (N:0,15-2,4 ng/ ml/h)	1,7 (0,6-2,7)	4 (3,3-7,1)	1,15 (0,57-3,6)	1,8 (0,8-1,8)	0,16
<b>Testosterona</b> (N: 0,1-0,8 ng/ml)	0,2 (0,1-0,6)	0,4 (0,2-0,8)	0,65 (0,42-1,9)	0,4 (0,2-0,4)	0,2

PS: pierde sal; VS: virilizante simple; NC: no clásica; C: críptica.  
 Datos expresados en mediana (p25-p75).



**Grafica 3:** Cortisol basal en relación a las diferentes formas clínicas: **PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica.



**Grafica 4:** 17-OHP en relación a las diferentes formas clínicas: **PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica.

**Tabla 18. Tratamiento seguido en el momento del estudio.**

	<b>PS</b> <b>(N=21)</b>	<b>VS</b> <b>(N=12)</b>	<b>NC</b> <b>(N=8)</b>	<b>C</b> <b>(N=2)</b>	<b>P</b>
<b>Hidrocortisona</b> (mg/m <sup>2</sup> /día)	16,52 (4,15)	15,18 (5,64)	9,62 (5,32)	-	<0,001
<b>9αFluorhidrocortisona</b> (mg/día)	0,09 (0,03)	0,03 (0,025)	-	-	<0,001

PS: pierde sal; VS: virilizante simple; NC: no clásica; C: críptica.  
Datos expresados en media (desviación estándar).

## **I.7 DESCOMPENSACIONES CLINICAS**

De los veintiún pacientes con fenotipo pierde sal, catorce presentaron varios episodios de descompensación. Once de ellos tuvieron numerosos episodios, entre ocho y trece, mientras que otros tres tuvieron menos de 4 crisis adrenales.

Estas descompensaciones clínicas se registraron en menores de 2 años, excepto el niño que tuvo trece, siendo dos de ellas a los 3 y 4 años de edad.

Los otros siete pacientes con fenotipo pierde sal y el resto de pacientes con otras formas clínicas no sufrieron descompensaciones clínicas.

Todos ellos cumplían adecuadamente el tratamiento con gluco y mineralcorticoides.

Se recuperaron el 65% de los informes médicos del episodio de descompensación clínica, ya que el sistema informático se instauró en el Hospital Gregorio Marañón en marzo de 2004 por lo que no se pudo tener acceso a los informes de urgencias previo a este momento. El 84% de los padres habían duplicado ya la dosis de glucocorticoides antes de acudir al hospital. El motivo de consulta más frecuente fue la fiebre asociada a decaimiento y vómitos. A su llegada al centro hospitalario presentaban regular estado general, decaimiento, intensa palidez de piel, con tensión arterial normal sin asociar taquicardia a pesar de la fiebre, iones y glucosa en sangre dentro de la normalidad.

El motivo de consulta y los parámetros clínicos y analíticos en el momento de ser atendidos en urgencias son los siguientes:

Motivo de consulta	%
Fiebre	86,5%
Vómitos	74,3%
Decaimiento	68,2%
Diarrea	10,9%
Tos	3,6%

**Tabla 19. Parámetros clínicos y analíticos en el servicio de urgencias.**

<b>TAs</b>	<b>TAd</b>	<b>FC</b>	<b>T° (°C)</b>	<b>Na (mmol/L)</b>	<b>K (mmol/L)</b>	<b>Glu (mg/dl)</b>
106 (11,46)	68 (8,88)	108 (20,4)	38,01 (1,3)	135,1 (3,99)	3,9 (0,55)	85,2 (15,8)

**TAs:** tensión arterial sistólica; **TAd:** tensión arterial diastólica; **FC:** frecuencia cardiaca; **T°:** temperatura.

Datos expresados en media (desviación de estándar).

Para su estabilización precisaron expansión con cristaloides y administración de hidrocortisona vía parenteral, permaneciendo monitorizados en una sala de observación. Posteriormente el paciente podía ser dado de alta con la dosis de glucocorticoides duplicada durante 3 días y vigilancia clínica estrecha o ser ingresado para continuación del tratamiento i.v., en función de la mejoría clínica, distancia del domicilio al hospital, ansiedad familiar o experiencia del médico que lo atendió.

## II.-GENETICA DE LOS PACIENTES CON HSC

El análisis molecular de las alteraciones del gen CYP21A2 permitió clasificar a los pacientes en 4 grupos (Grupo 1, 2, 3 y 4) en función de la actividad enzimática que confiere la enzima 21-hidroxilasa, como se ha descrito previamente [8-13].

### **Grupo 1 (N=10 (23,3%))**

Pacientes que son homocigotos o heterocigotos compuestos para las mutaciones cuya actividad de la 21 hidroxilasa es 0% (deleciones del gen, conversiones, deleciones de 8 pares de bases, Gln318/X Arg356Trp, 316Inst):

1. 306Inst / Deleción-conversión (1)
2. 306Isnt + val281leu / Deleción-conversión (1)
3. 306Isnt + val281leu / Arg356Trp (1)
4. Deleción-conversión / conversión del gen (1)
5. Arg356Trp / 655G + deleción8pb (1)
6. Arg356Trp / Gln318Stop (1)
7. Deleción 8pb + Val281Leu / Deleción del gen (1)
8. Gln318Stop / Gln318Stop (1)
9. Gln318Stop + Trp356 / Gln318Stop (1)
10. Ile172Asn + Gln318Stop / Arg356Trp (1)

### **Grupo 2 (N=10 (23,3%))**

Alteración del intrón2 en homo/hemicigosis con otro del grupo 1.

#### ➤ Alteración del intrón 2 en heterocigosis con otro del grupo 1:

1. 655G / deleción del gen (2)
2. 655G / Gln318Stop (1)
3. 655G / Val281Leu+306InsT (1)
4. Deleción-conversión / 655G (1)
5. 655G +Val281Leu / conversión del gen (1)
6. Conversión del gen / 655G (2)
7. Gln318Stop / Val281Leu + 655G (1)

#### ➤ Alteración del intrón 2 en homocigosis:

1. 655G / 655G (1)

### **Grupo 3 (N=6 (14%))**

Incluye a los pacientes en homocigosis para la mutación Ile172Asn o en heterocigosis con otro del grupo 1 ó 2:

#### ➤ Mutación Ile172Asn en heterocigosis con otro del grupo 1:

1. Ile172Asn / Deleción-conversión (3)

2. Ile172Asn +Val281Leu / Gln318Stop (1)

3. Arg426His / Ile172 Asn + Val281Leu (1)

La mutación Arg426His es una mutación asociada a formas clásicas pierde sal o virizante simple [14, 15]

➤ Mutación Ile172Asn en heterocigosis con otro del grupo 2:

1. Ile172Asn / 655G (1)

➤ Mutación Ile172Asn en homocigosis:

1. Ninguno

#### **Grupo 4 (N=17 (39,5%))**

Incluye a los pacientes en homocigosis para la mutación Pro30Leu, Pro453Ser o Val281Leu o en heterocigosis con otro del grupo 1, 2 ó 3:

➤ Mutación Pro30Leu, Pro453Ser o Val281Leu en heterocigosis con otro del grupo 1:

1. Arg356Trp / Val281Leu (1)
2. Delección 8pb / Val281Leu (1)
3. 655G+Val281Leu / Pro453Ser (1)

➤ Mutación Pro30Leu, Pro453Ser o Val281Leu en heterocigosis con otro del grupo 2:

1. 655G / Val281Leu (4)

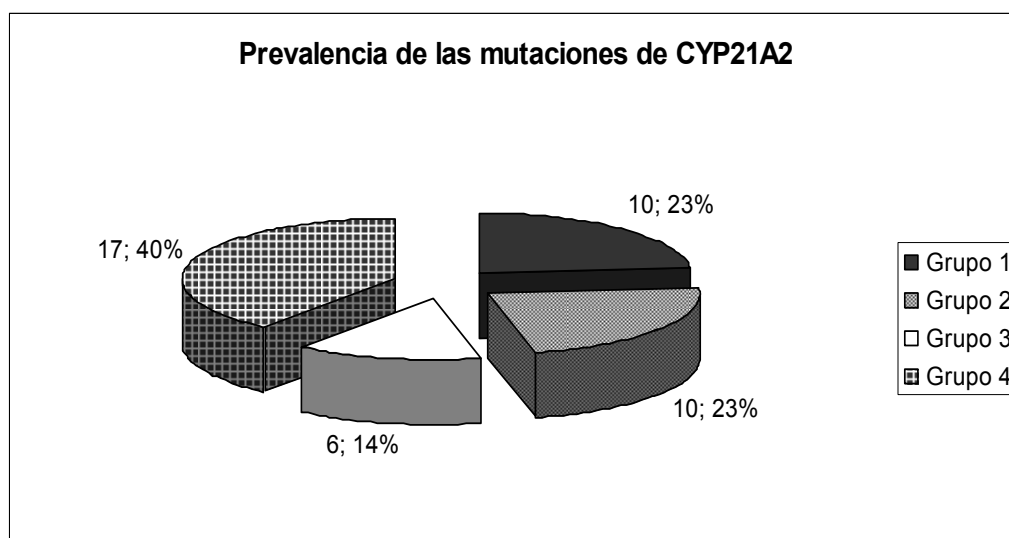
➤ Mutación Pro30Leu, Pro453Ser o Val281Leu en heterocigosis con otro del grupo 3:

1. Ile172Asn / Val281Leu (4)
2. Ile172Asn / Asp287Hys+Val281Leu (1)

➤ Mutación Pro30Leu, Pro453Ser o Val281Leu en heterocigosis /homocigosis con otro del grupo 4:

1. Pro453ser / Pro30leu (1)
2. Pro30leu / Val281Leu (1)
3. Val281Leu/ Val281Leu (3)





La caracterización molecular de los 86 alelos permitió establecer la frecuencia de cada una de las mutaciones:

**Tabla 20. Frecuencia de mutaciones en los 86 alelos analizados.**

	Alelos encontrados	%
Val281Leu	17	19,7
Delección-conversión	15	17,4
655G	14	16,2
Ile172Asn	9	10,4
Gln318Stop	7	8,1
Arg356Trp	5	5,8
655G+Val281Leu	3	3,4
306InsT+Val281Leu	3	3,4
Pro30Leu	2	2,3
Ile172Asn+Val281Leu	2	2,3
Pro453Ser	2	2,3
Ile172Asn+Gln318Stop	1	1,1
Gln318Stop+Arg356Trp	1	1,1
Delección 8pb+Val281Leu	1	1,1
Delección 8pb	1	1,1
Arg426Hys	1	1,1
Asp287Hys	1	1,1
306InsT	1	1,1

Las delecciones o conversiones grandes del gen funcional constituyen el 19,6% de las mutaciones. La mutación puntual severa más frecuente en esta serie es un cambio de aminoácido 655AóC/G que afecta al procesamiento del ARNm y se localiza en el intrón 2 (19,8%). El resto de mutaciones puntuales severas presentan frecuencias menores y son del tipo codones de parada, Gln318Stop (10,3%) o

desplazamientos de la fase de lectura, como 306InsT (4,5%), delección de 8 pares de bases (2,3%), aunque también hay mutaciones de cambio de aminoácido que afectan a regiones importantes para la funcionalidad de la proteína, como Arg356Trp (5,8%).

La mutación de cambio de aminoácido Ile172Asn del exón 4, que se asocia fuertemente con las formas virilizantes simples, se ha presentado en el 13,3% de las mutaciones. La mutación Arg426Hys se asocia a formas severas [14-16].

Las formas tardías presentan en general mutaciones de cambio de aminoácido (en zonas de regulación de la actividad enzimática, unión de protón, de grupo protético o interacción con enzimas auxiliares como la reductasa), siendo Val281Leu (26,5%) la más frecuente, seguido de Pro453Ser (2,3%), de Pro30Leu (1,9%) y Asp287Hys[13].

### III.-NIVELES DE CATECOLAMINAS EN ORINA

Se transformó la variable cuantitativa continua: niveles de adrenalina, noradrenalina y dopamina en orina en una variable dicotómica. Se dio el valor “No” para aquellos valores  $\leq -2,5$  D.E para la edad o fuera del rango inferior de la normalidad en la edad adulta y “Si” para aquellos valores  $> -2,5$  D.E o en rango para la edad adulta [17].

De los cuarenta y tres pacientes, once de ellos presentaron déficit de adrenalina en orina en 24 horas, mientras que ninguno de ellos presentó déficit de noradrenalina ni de dopamina. Solo tres pacientes con valores indetectables de adrenalina en orina tuvieron valores de noradrenalina y de dopamina  $> 2,5$  D.E.

**Tabla 21. Conversión de los niveles de adrenalina en orina a: presencia/ausencia de adrenalina.**

	Dx	Edad (años)	Adrenalina			Noradrenalina			Dopamina		
			(µgr/24h)	DE		(µgr/24h)	DE		(µgr/24h)	DE	
1	PS	12,19	<2	Indetect	No	22	-1,54	Si	168	-2,21	Si
2	PS	4,19	<2	Indetect	No	11	-0,36	Si	198	0,63	Si
3	PS	26,03	2	Normal	Si	17	Normal	Si	136	Normal	Si
4	PS	19,9	4	Normal	Si	14	Normal	Si	206	Normal	Si
5	PS	7,10	3	-0,50	Si	12	-1,49	Si	162	-0,51	Si
6	PS	8,03	2	-0,95	Si	14	-1,14	Si	266	0,89	Si
7	PS	9,72	<2	No	No	59	6,75	Si	453	3,42	Si
8	PS	3,01	<2	No	No	12	0,89	Si	90	0,13	Si
9	PS	8,07	6	0,86	Si	26	0,96	Si	220	0,27	Si
10	PS	3,58	<2	Indetect	No	52	8,36	Si	425	4,68	Si
11	PS	1,3	<2	Indetect	No	5	-0,70	Si	93	0,20	Si
12	PS	5,03	3	0,67	Si	20	1,55	Si	181	0,32	Si
13	PS	16,25	4	Normal	Si	32	Normal	Si	297	Normal	Si
14	PS	14,6	4	-0,50	Si	23	-1,39	Si	147	-2,59	No
15	PS	2,99	<2	Indetect	No	29	Normal	Si	191	Normal	Si
16	PS	17,37	<2	Indetect	No	28	Normal	Si	679	Normal	Si
17	PS	2,96	2	0,00	Si	19	2,48	Si	154	1,61	Si
18	PS	2,40	<2	Indetect	No	12	0,89	Si	197	2,61	Si
19	PS	7,05	<2	Indetect	No	30	1,67	Si	164	-0,49	Si
20	PS	3,8	<2	Indetect	No	4	-1,85	Si	81	-1,46	Si
21	PS	13,39	19	8,88	Si	93	8,75	Si	315	0,41	Si
22	VS	20,72	8	Normal	Si	49	Normal	Si	202	Normal	Si
23	VS	10,40	6	0,75	Si	40	1,07	Si	299	0,13	Si
24	VS	4,78	4	1,78	Si	10	-0,57	Si	96	-1,20	Si
25	VS	3,11	3	0,67	Si	16	0,70	Si	174	0,20	Si
26	VS	3,2	3	0,67	Si	21	1,77	Si	137	-0,46	Si
27	VS	5,09	2	-0,44	Si	16	0,70	Si	94	-1,23	Si
28	VS	3,58	10	8,44	Si	23	2,19	Si	250	1,55	Si
29	VS	10,6	3	-1,13	Si	19	-1,97	Si	255	-0,66	Si
30	NC	10,24	4	-0,05	Si	48	2,23	Si	330	0,68	Si
31	NC	9,06	2	-0,95	Si	20	-0,09	Si	218	0,24	Si
32	NC	10,12	7	5,11	Si	34	2,37	Si	210	0,14	Si
33	NC	10,7	4	-0,50	Si	41	1,22	Si	336	0,79	Si
34	NC	11,79	8	2,00	Si	29	-0,52	Si	236	-1,00	Si
35	NC	9,34	5	0,41	Si	19	-0,26	Si	196	-0,05	Si
36	NC	10,21	4	-0,50	Si	26	-0,96	Si	244	-0,86	Si
37	NC	8,42	3	-0,50	Si	15	-0,96	Si	195	-0,07	Si
38	NC	9,52	5	0,41	Si	16	-0,79	Si	136	-0,86	Si
39	NC	9,54	8	1,77	Si	18	-0,44	Si	265	0,88	Si
40	NC	12,67	6	0,75	Si	37	0,64	Si	327	0,63	Si
41	NC	3,79	3	-0,50	Si	14	0,28	Si	133	-0,54	Si
42	C	9,03	4	-0,05	Si	12	-1,49	Si	126	-1,00	Si
43	C	8,91	9	2,63	Si	36	2,72	Si	304	1,41	Si

**PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica; **Indetect:** indetectable

**Si=** valores de adrenalina, noradrenalina y dopamina >-2.5 D.E ajustado para la edad en niños o en rango de la normalidad en adultos.

**No=** valores de adrenalina, noradrenalina y dopamina ≤-2.5 D.E ajustado para la edad en niños o fuera del rango inferior a la normalidad en adultos.

**Tabla 22. Presencia/ausencia de catecolaminas en orina.**

	<b>Adrenalina</b>		<b>Noradrenalina</b>		<b>Dopamina</b>	
	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>
<b>PS</b> <b>N=21</b>	10	11	21	0	21	0
<b>VS</b> <b>N=8</b>	8	0	8	0	8	0
<b>NC</b> <b>N=12</b>	12	0	12	0	12	0
<b>C</b> <b>N=2</b>	2	0	2	0	2	0

**PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica.

**SI=** Numero de pacientes con valores de adrenalina, noradrenalina y dopamina  $>-2.5$  D.E ajustado para la edad en niños o en rango de la normalidad en adultos.

**NO=** Número de pacientes con valores de adrenalina, noradrenalina y dopamina  $\leq -2.5$  D.E ajustado para la edad en niños o fuera del rango inferior a la normalidad en adultos.

## IV.- RELACIÓN GENOTIPO – FENOTIPO

La tabla 14 muestra la relación entre el fenotipo esperado para cada una de las mutaciones de CYP21 y el fenotipo de nuestros pacientes.

Todos los pacientes del grupo 1 tienen mutaciones que impiden la actividad enzimática en homocigosis o heterocigosis compuesta. La correlación genotipo/fenotipo para el grupo 1 es 10/10.

Los pacientes del grupo 2, con mutaciones del procesamiento del RNAm del intrón2 en homocigosis o heterocigosis compuesta con otra mutación mas grave también se manifestaron con el fenotipo pierde sal. La correlación genotipo/fenotipo para el grupo 2 es 10/10.

Todos los pacientes del grupo 3 presentan un fenotipo virilizante simple, excepto un paciente presentaba una mutación en heterocigosis compuesta de Arg426His y Ile172Asn + Val281Leu y clínicamente era una forma pierde sal. Esta paciente había sido diagnosticada de forma pierde sal en otro país por clínica compatible. La correlación genotipo/fenotipo para el grupo 3 es 7/6.

Los pacientes del grupo 4 presentan en su mayoría formas tardías de la enfermedad, excepto 2 pacientes que están asintomáticos a la edad de 8 y 9 años de

edad y otros 3 casos que son formas virilizante simple. Estos cinco últimos pacientes fueron diagnosticados por cifras elevadas de 17-OHP en el programa de detección precoz de la Comunidad Autónoma de Madrid. La correlación genotipo/fenotipo en las formas virilizantes simples es de 17/12.

**Tabla 23. Genotipo, fenotipo esperado y fenotipo clínico.**

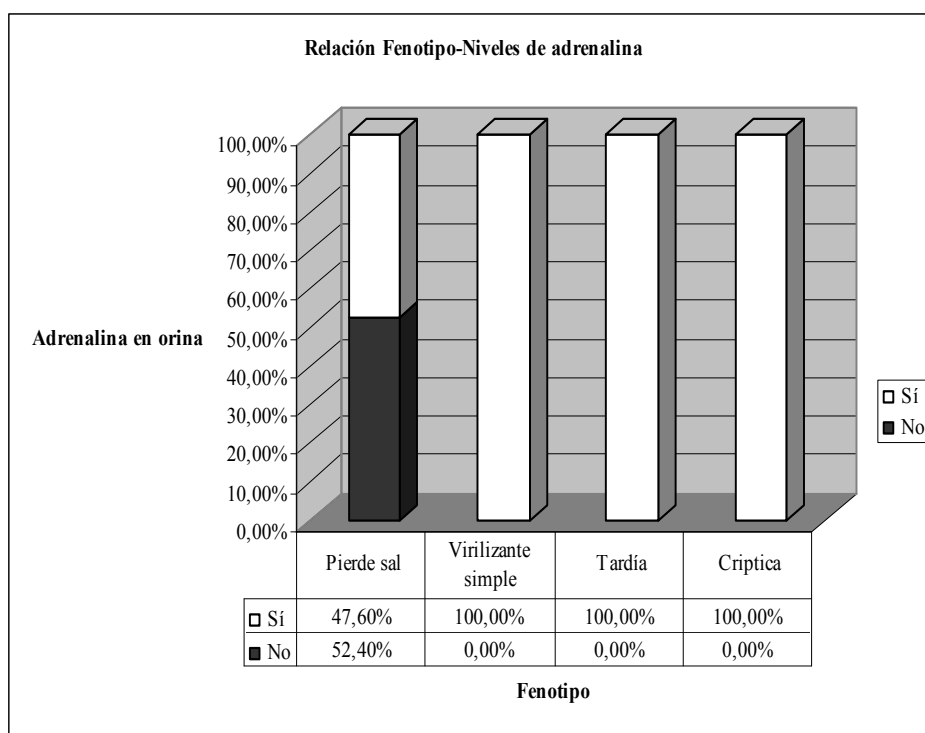
Genotipo	Genotipo (clasificación)	Fenotipo esperado	Fenotipo clínico			Total
			PS	VS	NC	
306Inst / Deleción-conversión	1	PS	1	0	0	1
306Isnt + Val281leu / Deleción-conversión	1	PS	1	0	0	1
306Isnt + Val281leu / Arg356Trp	1	PS	1	0	0	1
Deleción-conversión / Conversión del gen	1	PS	1	0	0	1
Arg356Trp / 655G + Deleción8pb	1	PS	1	0	0	1
Arg356Trp / Gln318Stop	1	PS	1	0	0	1
Deleción 8pb + Val281Leu / Deleción del gen	1	PS	1	0	0	1
Gln318Stop / Gln318Stop	1	PS	1	0	0	1
Gln318Stop + Trp356 / Gln318Stop	1	PS	1	0	0	1
Ile172Asn + Gln318Stop / Arg356Trp	1	PS	1	0	0	1
655G / Deleción del gen	2	PS-VS	2	0	0	2
Conversión del gen / 655G	2	PS-VS	2	0	0	2
655G / Gln318Stop	2	PS-VS	1	0	0	1
655G / Val281Leu+306InsT	2	PS-VS	1	0	0	1
Deleción-conversión / 655G	2	PS-VS	1	0	0	1
655G +Val281Leu / Conversión del gen	2	PS-VS	1	0	0	1
Gln318Stop / Val281Leu + 655G	2	PS-VS	1	0	0	1
655G / 655G	2	PS-VS	1	0	0	1
Ile172Asn / Deleción-conversión	3	VS	0	3	0	3
Ile172Asn +Val281Leu / Gln318Stop	3	VS-NC	0	1	0	1
Arg426His / Ile172 Asn + Val281Leu	3	VS	1	0	0	1
Ile172Asn / 655G	3	VS	0	1	0	1
Arg356Trp / Val281Leu	4	NC	0	1	0	1
Deleción 8pb / Val281Leu	4	NC	0	0	0	0+1(C)
655G+Val281Leu / Pro453Ser	4	NC	0	0	1	1
655G / Val281Leu	4	NC	0	0	4	4
Ile172Asn / Val281Leu	4	NC	0	0	3	3+1
Pro453ser / Pro30leu	4	NC	0	1	0	1
Pro30leu / Val281Leu	4	NC	0	0	1	1
Val281Leu/ Val281Leu	4	NC	0	0	3	3
Ile172Asn / Asp287Hys	4	NC	0	1	0	1
			21	8	12	41+2 (C)

**PS:** pierde sal; **VS:** virilizante simple; **NC:** no clásica; **C:** críptica.

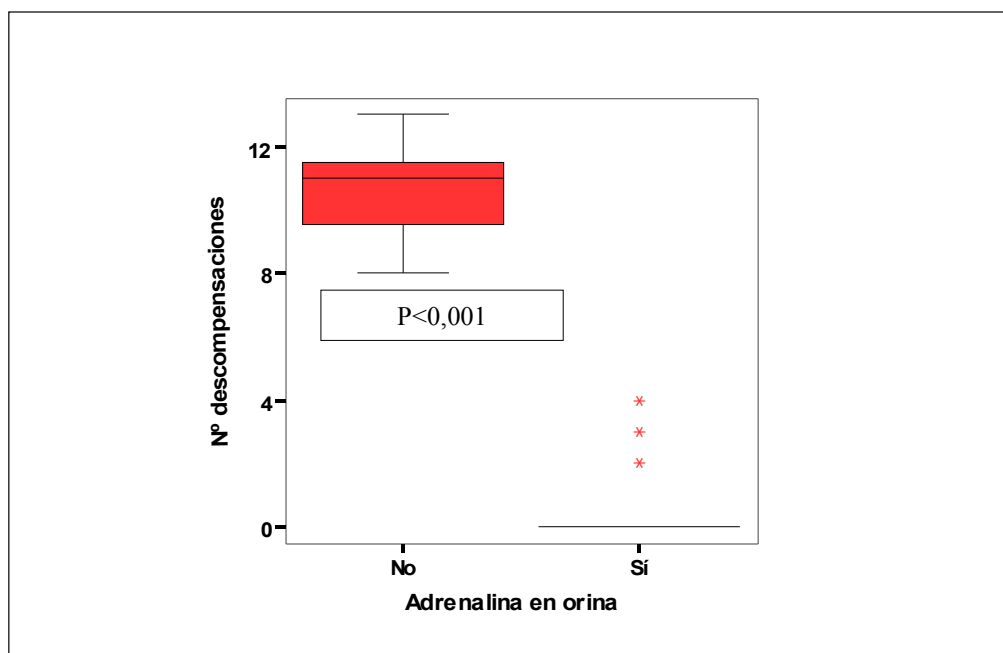
## V.-RELACIÓN FENOTIPO – NIVELES DE ADRENALINA

Todos los pacientes con niveles de adrenalina indetectables pertenecen a la forma clínica pierde sal. La ausencia o no de adrenalina en orina está asociado a las formas clínicas de la enfermedad ( $p<0,001$ ).

De los 21 con forma clínica pierde sal, diez (47,6%) presentan valores de adrenalina en rango para la edad, mientras que once (52,4%) presentan niveles de adrenalina indetectables en orina, siendo estos últimos los pacientes que han presentado mayor número de crisis, sobre todo los 2 primeros años tras el diagnóstico.



Todos los pacientes con ocho o más descompensaciones registradas presentan niveles indetectables de adrenalina en orina, mientras que los que sí tienen adrenalina en orina habían presentado menos de cuatro crisis adrenales.



**Gráfica 5: Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y el número de descompensaciones.** Todos los pacientes sin adrenalina en orina presentaron más de ocho descompensaciones, mientras que aquellos con menos de cuatro descompensaciones clínicas sí tenían adrenalina en orina.

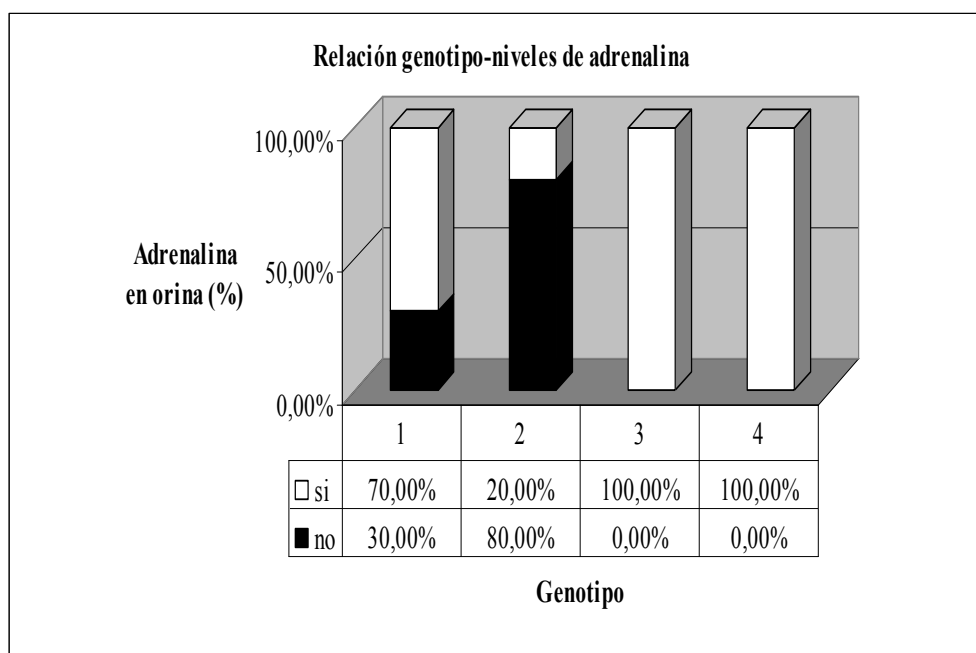
El valor predictivo positivo de la presencia de adrenalina en orina para la forma pierde sal es del 47%, mientras que para el resto de formas clínicas es del 100%

## VI.-RELACION GENOTIPO - NIVELES DE ADRENALINA

Once (25,5%) de los cuarenta y tres pacientes tienen déficit de adrenalina en orina y genéticamente presentan mutaciones con nula o mínima actividad de CYP21A2: tres pacientes tienen mutaciones que impiden la actividad enzimática de 21-hidroxilasa en ambos alelos (grupo 1), mientras que los otros 8 son heterocigotos compuestos para mutaciones del intrón 2 (grupo2).

Treinta y dos pacientes (74,5%) presentaban niveles de adrenalina en orina dentro de la normalidad para la edad. De éstos, siete pertenecen al grupo 1 (nula actividad enzimática), dos pertenecen al grupo 2, siendo uno de ellos homocigoto para la alteración en el intrón 2 y el otro heterocigoto compuesto con una delección del gen funcional, y los otros veintiséis presentaban alteraciones genéticas más leves.





La presencia o no de adrenalina en orina está asociado a la severidad de la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa ( $p < 0,001$ ). La ausencia de adrenalina en orina predice un genotipo grave en el 100% de los casos.

## VII.- COMPARACIÓN ENTRE LOS PACIENTES CON FENOTIPO PIERDE SAL EN RELACIÓN A LOS NIVELES DE ADRENALINA

De los 21 pacientes con la forma clínica pierde sal, 11 no presentaban adrenalina en orina y 10 si. Se realizaron comparaciones clínicas (edad, tensión arterial, *Z-score desviation standard* de peso, talla, IMC y de la talla corregido para la edad ósea), analíticas (17-OHP, ACTH, aldosterona, cortisol basal, renina), de tratamiento (dosis de hidrocortisona y  $9\alpha$ -fluorhidrocortisona) recibidas.

### **VII.1-DATOS AUXOLÓGICOS**

A pesar de ser menor el *Z - score desviation standard* de talla, el *Z- score desviation standard* de talla en relación a la edad ósea y el *Z- score desviation*

*standard* de pronóstico de talla en los niños con déficit de adrenalina en orina comparado con los que no tenían déficit, no se vieron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon ambos grupos ( $p=0,11$ ,  $p=0,35$  y  $p=0,56$  respectivamente). Los pacientes sin adrenalina en orina tenían un IMC más bajo ( $p=0,07$ ) y eran significativamente más jóvenes ( $p=0,038$ ) que los que sí tenían adrenalina en orina. Todos los pacientes presentaron tensión arterial en normal excepto un paciente con la forma clásica pierde sal, con TA  $>90$ . No se observaron diferencias en la tensión arterial sistólica ni diastólica entre los diferentes grupos ( $p=0,88$  y  $0,84$  respectivamente).

No se observaron diferencias en el *Z- score desviación standard* de la talla diana entre los dos grupos, ni en el pronóstico de talla, siendo significativamente mayor en los pacientes sin adrenalina en orina.

**Tabla 24. Datos auxológicos, edad y tensión arterial de los pacientes con fenotipo fierde sal.**

	<b>Déficit adrenalina (N=11)</b>	<b>No déficit adrenalina (N=10)</b>	<b>P</b>
<b>Edad</b>	6,14 (4,99)	12,14 (7,24)	0,038
<b>TAs (mmHg)</b>	109 (21,1)	110,2 (15,16)	0,88
<b>TAd (mmHg)</b>	64,27 (11,75)	65,4 (13,59)	0,84
<b>Z-talla</b>	-0,71 (0,48)	-0,28 (0,69)	0,11
<b>Z-peso</b>	-0,42 (0,97)	0,43 (1,05)	0,08
<b>Z-IMC</b>	-0,08 (1,15)	1,0 (1,43)	0,07
<b>Z-talla para la EO</b>	0,27 (1,16)	0,77 (0,99)	0,35
<b>Z-talla diana</b>	0,05 (1,19)	-0,21 (1,10)	0,5
<b>Z-pronóstico talla</b>	0,1 (0,31) N=5	0,42 (1,01) N=8	0,56

Datos expresados en media (desviación estándar).

**Z-talla:** *Z-Score desviación estándar* de la talla; **Z-peso:** *Z-Score desviación estándar* del peso; **Z-talla para la EO:** *Z-Score desviación estándar* de la talla para la edad ósea; **Z-talla diana:** *Z-Score desviación estándar* de la talla diana; **Z-pronóstico de talla:** *Z-Score desviación estándar* del pronóstico de talla.

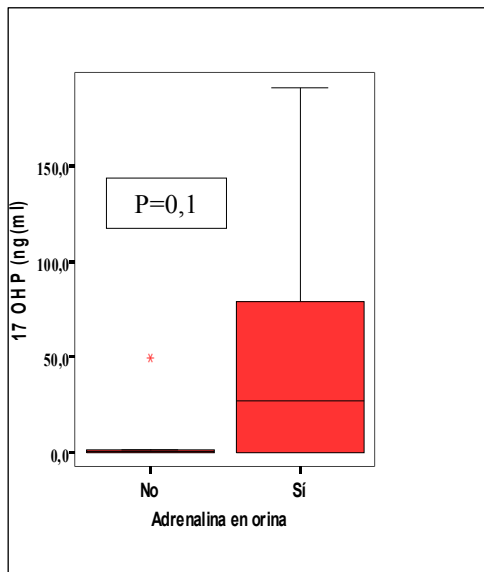
## VII.2\_ DATOS ANALÍTICOS

La media de 17-OHP, ACTH, androstendiona, aldosterona y ARP fueron menores en los pacientes con déficit de adrenalina en orina, sin embargo, estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en los valores de 17-OHP de cortisol ( $p=0,002$ ), androstendiona ( $p=0,01$ ) y aldosterona ( $0,05$ ).

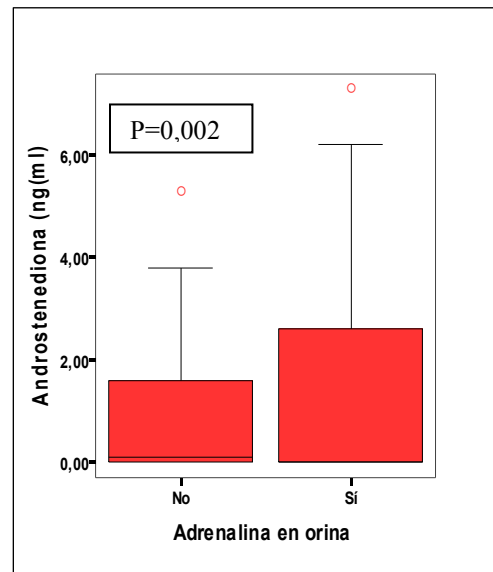
**Tabla 25. Datos analíticos en los pacientes con fenotipo pierde sal.**

	<b>Déficit adrenalina (N=11)</b>	<b>No déficit adrenalina (N=10)</b>	<b><i>P</i></b>
<b>17-OHP (N:0,1-1,5 ng/ml)</b>	0,4 (0,1-1,3)	26,7 (0,1-79)	0,106
<b>ACTH (10-50 pg/ml)</b>	45 (30,9-122)	71 (34-271)	0,5
<b>Cortisol (N: 5-25 µg/dl)</b>	0 (0-0)	2,08 (1,1-2,8)	<i>0,002</i>
<b>Androstenediona (N: 0,4-3,5 ng/ml)</b>	0 (0-0,4)	2,6 (0-5,3)	<i>0,01</i>
<b>Testosterona (N: 0,1-0,8 ng/ml)</b>	0,1 (0-0,2)	0,3 (0,08-2,13)	0,5
<b>Aldosterona (N: 10-150 pg/ml)</b>	50 (50-50)	50 (50-244)	<i>0,008</i>
<b>ARP (N:0,15-2,4 ng/ml/h)</b>	1,7 (0,3-2)	1,7 (0,8-3,1)	0,15

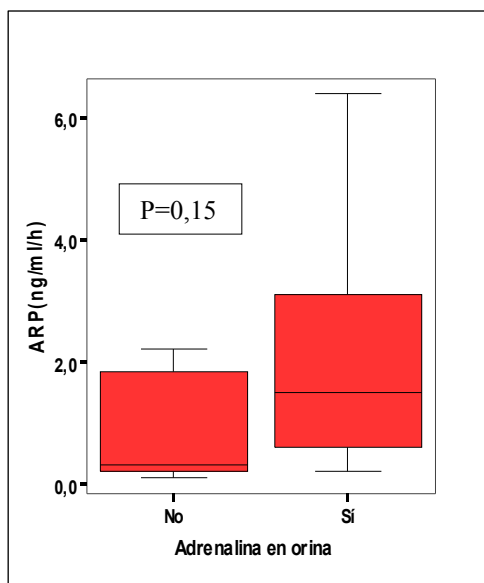
Datos expresados en media (desviación estándar).



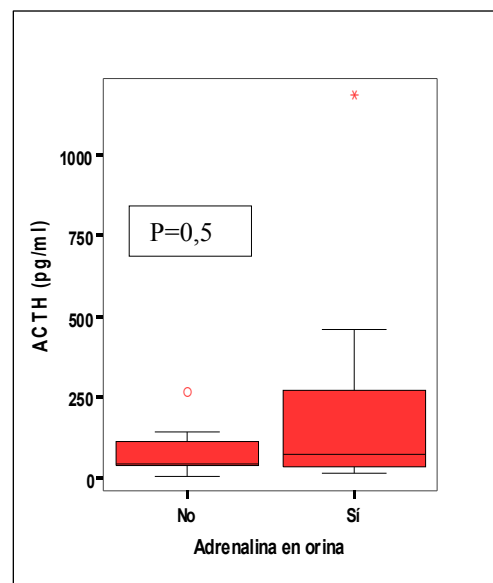
**Gráfica 6: Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y 17-OHP.**



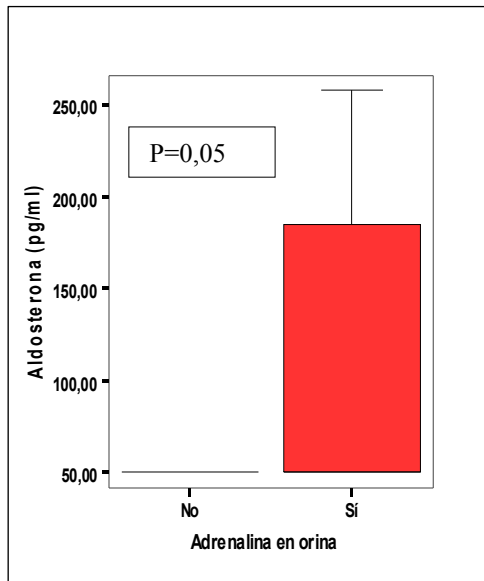
**Gráfica 7: Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y androstendiona.**



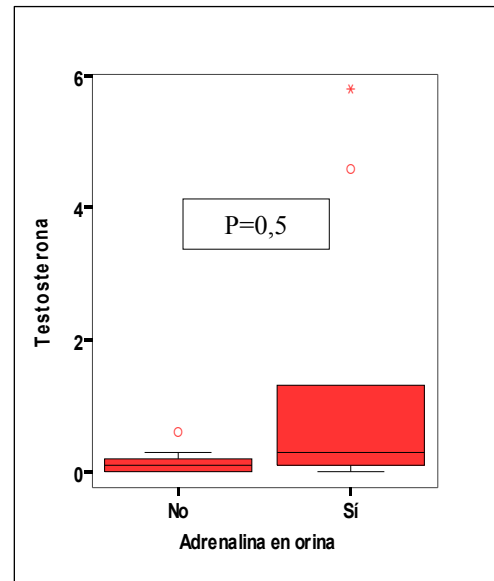
**Gráfica 8: Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y ARP.**



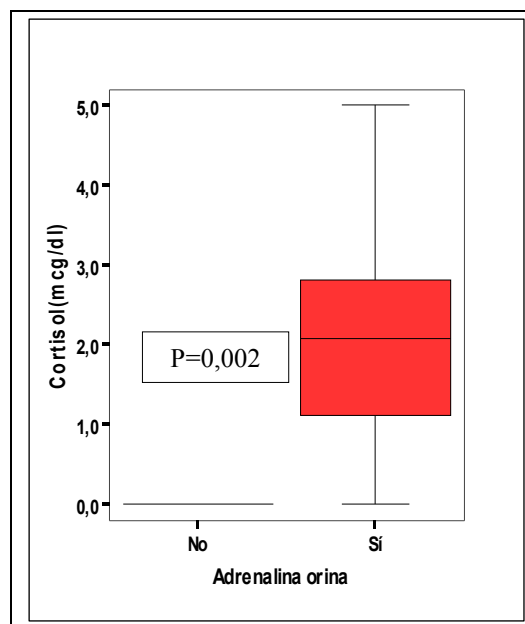
**Gráfica 9: Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y ACTH.**



**Gráfica 10: Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y aldosterona.**



**Gráfica 11: Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y testosterona total.**



**Gráfica 12: Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y cortisol.**

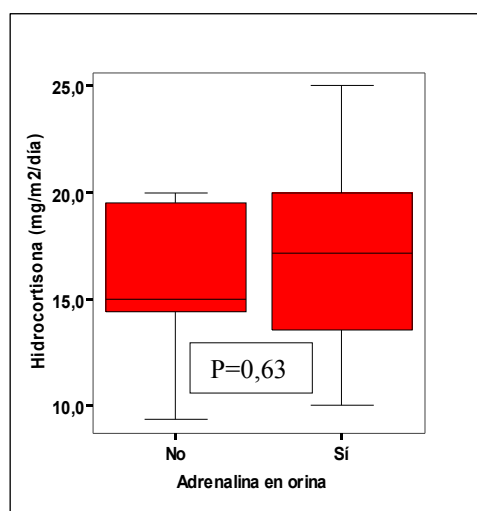
### VII.3\_ TRATAMIENTO

Todos los pacientes recibían tratamiento con gluco y mineralcorticoides. Aunque no existen diferencias entre la dosis media de glucocorticoides en ambos grupos, los pacientes sin adrenalina en orina presentan niveles menores de 17-OHP, ACTH, cortisol, renina y aldosterona que los pacientes con adrenalina en orina. La edad de estudio en los niños sin adrenalina en orina fue significativamente menor, siendo 8 de los 11 pacientes prepúberes, mientras que 6 de los 10 niños con adrenalina en orina son púberes.

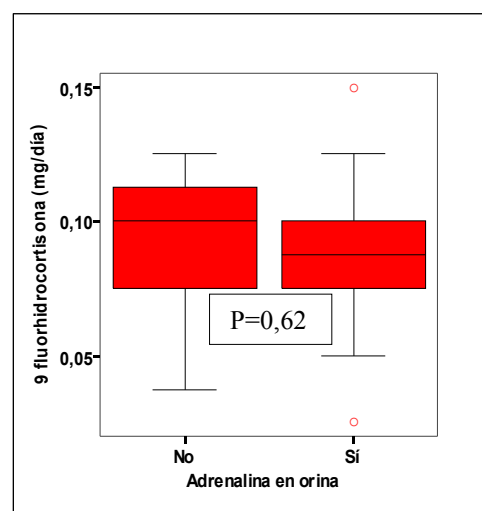
Tabla 26. Tratamiento en los pacientes con fenotipo pierde sal.

	<b>Déficit adrenalina (N=11)</b>	<b>No déficit adrenalina (N=10)</b>	<b><i>P</i></b>
<b>Hidrocortisona (mg/m<sup>2</sup>/día)</b>	16,08 (3,4)	16,98 (5,01)	0,6
<b>9<math>\alpha</math>Fluorhidrocortisona (mg/día)</b>	0,094 (0,08)	0,087 (0,11)	0,6

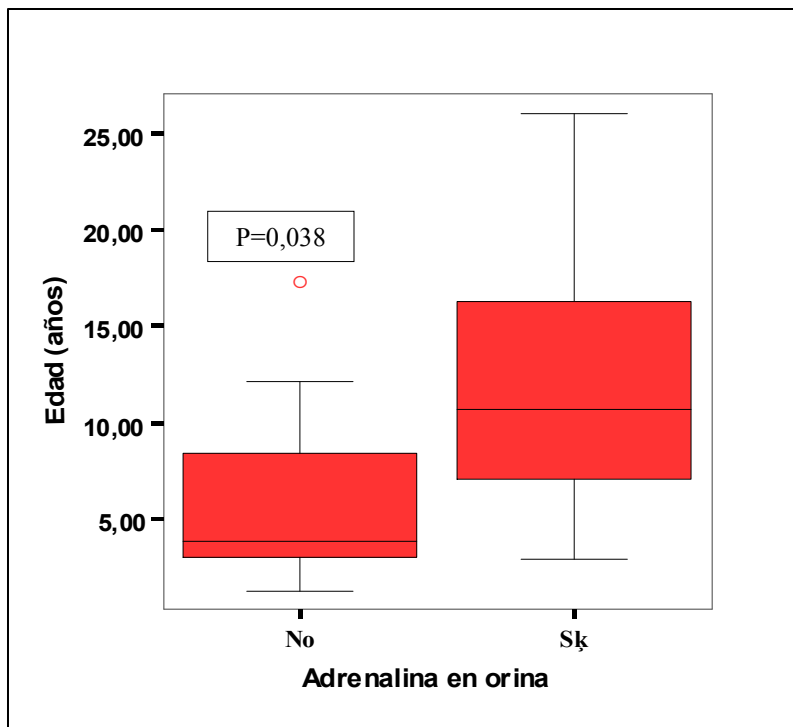
Datos expresados en media (desviación estándar).



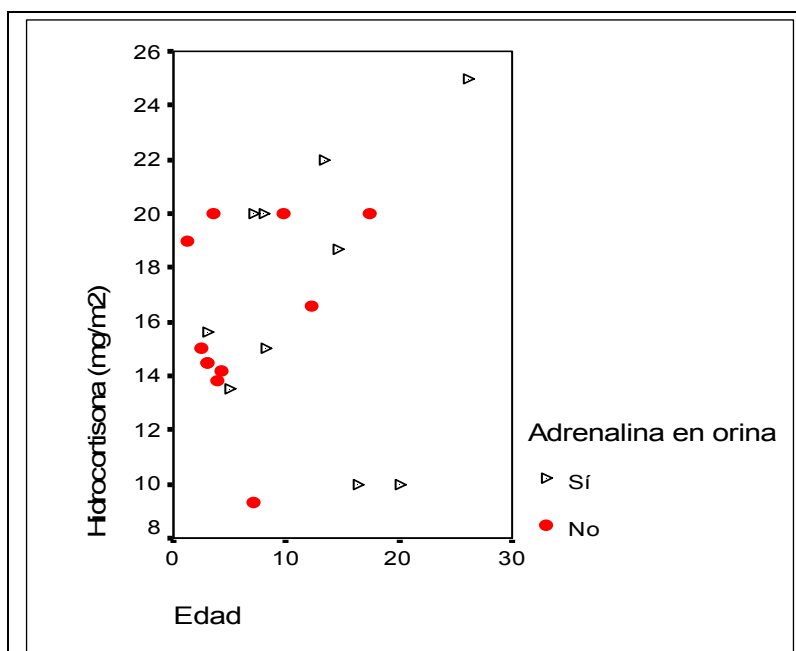
Gráfica 13: Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y dosis de hidrocortisona recibida.



Gráfica 14: Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y dosis de 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona recibida.



**Gráfica 15:** Relación de los pacientes con/sin adrenalina en orina y edad.



**Gráfica 16:** Grafica por puntos que relaciona individualmente la dosis de hidrocortisona en función de su edad y la presencia o no de adrenalina en orina.

## **DISCUSIÓN**



Existen pocos estudios que hayan evaluado la función medular en pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa, siendo todos ellos con escaso número de pacientes (285-288). Este es el primero que evalúa la función adrenomedular en un mayor número de pacientes, realizando una correlación clínica con el fenotipo y el genotipo (285, 286), así como un análisis retrospectivo de las descompensaciones clínicas, comparando los pacientes con fenotipo pierde sal con déficit de secreción de adrenalina de los que no.

Los dos sistemas endocrinos forman una unidad funcional y la alteración de uno de ellos puede tener efecto en el otro (98). Las células cromafines en una glándula suprarrenal normal están en estrecho contacto con las células de la corteza, las células del sistema inmune, células nerviosas y células endoteliales formando complejos circuitos de regulación intraadrenal (151, 164, 317-319). Estas interacciones paracrinas entre los diferentes componentes de la glándula juegan un importante papel en el desarrollo, proliferación celular, ritmo circadiano y zonificación de la glándula adrenal y son fundamentales para la producción basal hormonal y ajuste fino de la glándula ante situaciones de estrés o enfermedad (101, 194).

## **I.-RESULTADOS COMENTADOS**

### **I.1. FUNCION ADRENOMEDULAR EN PACIENTES CON HSC**

La observación en la práctica clínica de que pacientes con el fenotipo más grave de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa sean más susceptibles ante situaciones de estrés a pesar de un adecuado tratamiento con glucocorticoides es debido a una hipofunción adrenomedular.

Para el análisis de la función adrenomedular se ha realizado la medición de catecolaminas en orina: adrenalina, noradrenalina y dopamina. Como las catecolaminas dietarias son extensamente conjugadas antes de llegar a la circulación, los niveles de catecolaminas libres (no conjugadas) en plasma y orina son independientes de las influencias dietarias y reflejan con mayor seguridad la producción endógena (74). Toda la adrenalina circulante deriva prácticamente de la médula suprarrenal, porque la liberada por el sistema nervioso central no puede atravesar la barrera hematoencefálica. Por el contrario, la noradrenalina proviene de

la difusión desde las sinapsis noradrenérgicas de las neuronas simpáticas postganglionares. Gran parte de la dopamina en orina procede de la síntesis de novo en los túbulos renales a partir del precursor DOPA, ejerciendo de natriurético. Por ello, la excreción urinaria de dopamina refleja una regulación local renal derivada de la DOPA circulante, no de la filtración de la dopamina circulante (49, 75).

La disfunción adrenomedular en este estudio se ha caracterizado por una disminución de adrenalina en orina, no encontrándose relación con la noradrenalina o dopamina.

Encontramos que no todos los pacientes con el fenotipo pierde sal presentaban disfunción adrenomedular, sino sólo aquellos pacientes con numerosas descompensaciones. El 66,6% de los pacientes con fenotipo pierde sal habían presentado algún episodio de descompensación, mientras que los pacientes con otras formas clínicas no. Solo los que presentaron ocho o más descompensaciones clínicas tenían disfunción adrenomedular.

Estas crisis adrenales se caracterizan, en el momento de ser atendidos en urgencias, por presentar tensión arterial dentro de los límites normales para la edad, sin asociar taquicardia a pesar de la fiebre y en su mayoría iones y glucosa en sangre dentro de la normalidad (Sodio: 135,1 (D.E: 3,99) mmol/L, potasio 3,9 (D.E: 0,55) mmol/L y glucemia 85,2 (D.E: 5,8) mg/dl). Este hecho, unido a que el adecuado reemplazamiento con glucocorticoides y mineralcorticoides no pudiera prevenir las crisis adrenales, incluso a pesar de que el 84% de los padres habían doblado ya la dosis de glucocorticoides antes de ser atendidos en el servicio de urgencias, y que justamente son éstos los pacientes con disfunción medular, sugiere que la adrenalina juega un papel importante en esta situación de descompensación.

Todos los pacientes con disfunción adrenomedular presentan niveles indetectables de cortisol en sangre, lo que refleja la intensa afectación en la síntesis de glucocorticoides, precisando dosis mayores de hidrocortisona. La probabilidad de que las altas dosis de glucocorticoides produzcan una disminución en la síntesis de cortisol es menos probable debido a la vida media de la hidrocortisona. Se ha demostrado que en pacientes con HSC, las concentraciones de cortisol son máximas entre la primera y segunda hora tras la administración de hidrocortisona, siendo indetectables a las 7 horas tras la dosis matutina, y a las 9 horas tras la dosis nocturna (320, 321). En este estudio, todos los pacientes se realizaron la analítica sanguínea a primera hora de la mañana, previo a la toma de su medicación habitual, con un

intervalo de al menos 9-10 horas de la dosis nocturna. Esto sugiere que el cortisol analizado refleja con una mayor probabilidad la producción endógena de glucocorticoides.

Sin embargo, la dosis media de hidrocortisona en el momento del estudio es similar en todos los niños con el fenotipo pierde sal, tengan o no disfunción adrenomedular. El hecho de que los andrógenos suprarrenales estén más suprimidos en los niños con numerosas crisis adrenales sugiere que éstos últimos están recibiendo comparativamente dosis mayores de glucocorticoides. Estas diferencias se deben probablemente a la edad en el momento del estudio. Los pacientes con fenotipo pierde sal pero sin disfunción adrenomedular son puberales mientras que los niños con fenotipo pierde sal con disfunción adrenomedular son escolares. Durante la pubertad se produce una serie de alteraciones endocrinológicas que influyen en la farmacocinética del cortisol, dando lugar una inadecuada supresión del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal y un control subóptimo en las formas clásicas a pesar de un adecuado tratamiento (322, 323). Durante la pubertad aumenta el volumen de distribución y aclaramiento del cortisol, disminuyendo la vida media del cortisol libre en las niñas puberales con respecto a los varones (324). El aumento en el aclaramiento del cortisol en la pubertad es debido a una disminución en la actividad de la isoforma 1 de la 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 $\beta$ -HSDI), que se expresa en el hígado, gónadas, tejido adiposo y sistema nervioso central, convirtiendo la cortisona en cortisol (325-327). El aumento de GH e IGF-I producen una disminución de la actividad de 11 $\beta$ -HSDI y del cortisol sanguíneo. El estímulo de GH disminuye la secreción de 3 $\beta$ -HSD y aumenta 17,20 liasa, con el consiguiente aumento de andrógenos suprarrenales (328). La elevación de GH e IGF-I en la pubertad (329, 330) está asociada también a una marcada disminución en la sensibilidad a la insulina y una paralela elevación de las concentraciones de insulina en sangre (331), constituyendo un importante componente en la patogenia del hiperandrogenismo (332-334). Además, la insulina disminuye la actividad de 11 $\beta$ -HSDI y su expresión a nivel molecular, potenciando el hipocortisolismo y el hiperandrogenismo (335). Niños con HSC tienen una marcada elevación de las concentraciones de insulina de lo esperado por la pubertad, y una mayor insulinoresistencia que en pacientes sanos con el mismo IMC (336). Tanto el hipocortisolismo como el hiperandrogenismo aumentan la secreción de ACTH por el

sistema de retroalimentación, aumentando el hipocortisolismo por el aumento en el aclaramiento del cortisol. Por ello, el tratamiento de los pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa en este grupo de edad debería estar basado en el entendimiento de estas alteraciones fisiopatológicas, para adecuar la dosis y frecuencia de administración de los glucocorticoides, y prevenir o tratar el hiperandrogenismo y la insulinoresistencia (324).

El déficit de adrenalina en orina se correlaciona bien con el genotipo más severo (grupo 1 y 2), lo que sugiere que la gravedad de la hipofunción adrenomedular está directamente relacionada con el déficit enzimático, y consecuentemente, con la disfunción de la corteza. El 27% de los pacientes con disfunción adrenomedular tienen mutaciones que impiden la actividad de CYP21 (grupo 1), mientras que el 73% tienen mutaciones del procesamiento del RNAm del intrón2 en heterocigosis compuesta con otra mutación más grave (grupo 2). En este estudio, la mutación del intrón2 en heterocigosis compuesta con mutaciones más graves se ha comportado clínica, fenotípica y funcionalmente como si fuera una mutación del grupo 1.

Esta disfunción paralela en la función de la corteza y la médula en pacientes con HSC representa otro ejemplo de la unión anatómica y funcional en humanos, ofreciendo evidencia de que es preciso que la comunicación intraadrenal esté intacta para que la glándula suprarrenal ejerza su función (98, 337, 338). Estos hallazgos apoyan el concepto de la señalización e interacción entre la corteza y la médula, de forma que los glucocorticoides regulan la expresión de enzimas que participan en la síntesis de catecolaminas, como la tirosina hidroxilasa (79, 80), dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (81) y PNMT (284), mientras que las catecolaminas mejoran la esteroidogénesis estimulando la expresión de enzimas citocromo P450 (98, 105, 108, 110).

La disfunción medular observada en los pacientes con déficit de 21-hidroxilasa puede ser debida a una alteración en el desarrollo de la formación de la médula durante la embriogénesis (77, 339), probablemente por un déficit de cortisol intraútero, efectos no conocidos de CYP21A2, déficit de esteroides intraadrenales en el momento del estudio, un defecto en la expresión de PNMT (284) o una combinación de varios factores. Sin embargo, el hecho de que ni dosis mayores de hidrocortisona, ni la duplicación de la dosis de hidrocortisona oral durante la crisis

adrenal sean suficientes para aumentar la expresión de PNMT intraadrenal, sugiere un defecto en la formación y/o maduración de la glándula adrenal.

## I.2. IMPLICACIONES DEL DÉFICIT DE ADRENALINA

Las catecolaminas influyen prácticamente en todos los tejidos. Sin embargo, las implicaciones clínicas del déficit de adrenalina en humanos no están esclarecidas, aunque se piensa que tiene efecto en el control glucémico, sobre todo en los niños (340), y en el tono vascular (341). La disminución de la adrenalina podría explicar una **mayor susceptibilidad a desarrollar hipoglucemia** en niños con HSC (342-345), **inestabilidad cardiovascular ante situaciones de estrés** como son infecciones, traumatismos y la **poca tolerancia al ejercicio físico** (287).

Animales a los que se ha realizado una extirpación de la médula suprarrenal bilateralmente muestran intolerancia al ejercicio y un pobre control glucémico durante el ejercicio intenso o prolongado (346, 347), sin aumento de la frecuencia cardíaca compensatoria (348).

Un defecto en la regulación neuroadrenocortical puede contribuir a una mala adaptación al estrés en pacientes con déficit de 21 hidroxilasa. Este sistema está regulado por el sistema simpatoadrenal ACTH independiente, es importante durante el estrés para una fina regulación glandular y una buena adaptación aguda y crónica de la glándula a la inflamación, sepsis y alteraciones mentales (349-351).

Esto es particularmente importante en el periodo de transición a la vida extrauterina, cuando la glándula adrenal tiene que adaptarse al medio extrauterino relativamente hostil tras la disrupción de la unidad fetoplacentaria que se produce al nacimiento. Cercal del final de la gestación se produce un aumento de cortisol que está mediado fundamentalmente por la mayor producción de corticoides suprarrenales fetales y por una menor conversión de cortisol a cortisona. Este aumento de cortisol desencadena un aumento en la síntesis de surfactante en el tejido pulmonar, la reabsorción de líquido pulmonar, y de la actividad de PNMT medular, aumentando el paso de noradrenalina a adrenalina. También aumenta la actividad de yodotironina monodeyodinasas del anillo externo aumentando la conversión de T4 a T3, disminuyendo la sensibilidad del conducto arterial a las prostaglandinas, lo que facilita el cierre del conducto arterioso, induce la maduración de varias enzimas y los procesos de transporte del intestino delgado y estimula la maduración de las enzimas

hepáticas. Los efectos secundarios del cortisol también promueven adaptaciones intrauterinas. Los niveles elevados de T3 estimulan la unión de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, potencian la síntesis de surfactante en el tejido pulmonar y aumentan la sensibilidad del tejido adiposo marrón a la noradrenalina.

El aumento de catecolaminas durante el parto inducen adaptaciones cardiovasculares críticas, incluyendo el aumento de la presión sanguínea y de los efectos inotrópicos cardíacos, aumento de la secreción de glucagón, disminución de la secreción de insulina, termogénesis aumentada en el tejido adiposo marrón y niveles plasmáticos aumentados de ácidos grasos libres y adaptación pulmonar, incluyendo la movilización del líquido pulmonar y aumento de la liberación de surfactante. El déficit de glucocorticoides intrauterino puede afectar a la sensibilidad del sistema de retroalimentación postnatal, así como a la eficacia del tratamiento posterior (291). En la práctica clínica vemos que algunos pacientes que son avisados por el programa de detección precoz de HSC están o han estado ingresados en los primeros 3-5 días de vida por sepsis clínica no confirmada. Probablemente el déficit de cortisol, agravado por el déficit de catecolaminas, contribuya a esta mala adaptación extrauterina (352).

La disfunción adrenomedular puede contribuir a la **hipoglucemia**, muy común en pacientes con HSC, y **agrar la hipotensión** ante situaciones de estrés.

La adrenalina, junto con el glucagón, juega un importante papel en el restablecimiento de la glucemia tras una hipoglucemia. La adrenalina eleva los niveles de glucosa en sangre mediante dos mecanismos. Por un lado estimula en el hígado la glucogenolisis y la gluconeogénesis, e inhibe la síntesis de glucógeno, dando como resultado un aumento de la liberación hepática de glucosa. Por otro lado, en el páncreas inhibe la secreción de la insulina y aumenta la de glucagón. Además, antagoniza la acción de la insulina sobre la captación de glucosa por las células musculares y del tejido adiposo. La estimulación de la gluconeogénesis es más importante durante el ejercicio prolongado, cuando los depósitos de glucógeno están vacíos (353, 354). En adultos, si la hipoglucemia no ha sido desencadenada por el ejercicio, el efecto contrarregulador de la adrenalina no es importante siempre que la secreción del glucagón y la insulina estén intacta.

La adrenalina estimula la glucogenolisis en el músculo esquelético. Al no poseer éste la glucosa-6 fosfatasa, la glucosa producida no puede difundir a la circulación, aumentando la producción de ácido láctico. El ácido láctico constituirá

un sustrato adicional para la gluconeogénesis hepática. La adrenalina tiene una acción lipolítica, produce liberación de glicerol y ácidos grasos libres a partir de los triglicéridos almacenados en los adipositos.

La secreción de adrenalina por la médula durante el ejercicio físico o el estrés puede aumentar hasta 300 veces (72, 355, 356). Produce un efecto compensador para prevenir la hipoglucemia (357), mediante el consumo de glucógeno muscular, reutilización hepática del ácido láctico liberado por el músculo y aumento de los ácidos grasos libres como sustratos energéticos alternativos. En estos efectos metabólicos la adrenalina es mucho más potente que la noradrenalina. Los efectos cardiovasculares de la adrenalina no son exactamente iguales que los de la noradrenalina, debido a que su afinidad por los distintos receptores adrenérgicos es diferente. Tanto la adrenalina como la noradrenalina son inotropo y cronotropo positivo. La noradrenalina produce un aumento de la presión arterial media mediante una elevación de la presión sistólica y diastólica. Sin embargo, la adrenalina aumenta ligeramente la presión sistólica pero disminuye la presión diastólica.

El déficit de adrenalina puede ser responsable del riesgo de desarrollar hipoglucemia en niños con HSC durante enfermedades intercurrentes (299, 343-345). La hipoglucemia ejerce un efecto contrarregulador en el sistema nervioso central, causando síntomas como palpitaciones, sudor y ansiedad. Con el déficit de adrenalina, estos síntomas de alarma puede estar disminuidos, incluso ausentes, enmascarando la hipoglucemia (340). Consecuentemente, niños con HSC pueden tener no sólo riesgo de hipoglucemia, sino riesgo aumentado de un retraso en el reconocimiento y por tanto, en el tratamiento. Puede ser necesaria la suplementación con carbohidratos y glucosa ante situaciones de estrés, como son los procesos febriles o el ejercicio intenso. Consecuentemente, los niños con HSC pueden no sólo tener aumentado el riesgo de hipoglucemia, sino no reconocer los síntomas, y por lo tanto un retraso en el tratamiento. Por tanto, la administración de carbohidratos y suplementación de glucosa antes de un ejercicio prolongado o durante la enfermedad con fiebre puede ser una medida preventiva en niños con HSC. Las dosis extra de hidrocortisona durante el ejercicio intenso no influyeron en la capacidad de ejercicio, respuesta cardiorrespiratoria, glucemia, ni elevan los niveles de adrenalina ni de noradrenalina (288).

Las catecolaminas inhiben la secreción de insulina y leptina mediante la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (358-360), por lo que la deficiencia de

adrenalina puede dar lugar a **alteraciones en la regulación de la insulina y la leptina** (336, 361). De hecho, pacientes con HSC tienen niveles mayores de leptina e insulina que los sujetos sanos (336, 362, 363). La leptina es una proteína secretada por los adipocitos, actuando en el sistema nervioso central inhibiendo el apetito y en el sistema nervioso simpático activándolo (336, 364). Este aumento permanente de leptina se ha asociado a una mayor incidencia de obesidad, insulinoresistencia y diabetes mellitus tipo II (365-367). La hiperleptinemia disminuye la producción de cortisol disminuyendo la expresión de Star, predisponiendo a los pacientes a tener crisis adrenales más frecuentemente (368, 369). Tanto la hiperleptinemia como el hiperinsulinismo pueden aumentar la producción de andrógenos mediante la activación de enzimas que participan en la esteroidogénesis adrenal y ovárica, dificultando su manejo, contribuyendo al desarrollo de síndrome de ovario poliquístico, presente hasta el 76% en mujeres con HSC y las complicaciones cardiovasculares de la insulinoresistencia (370, 371).

Finalmente, similar a lo que sucede en la médula adrenal, el déficit de glucocorticoides también puede afectar a la síntesis de adrenalina en el cerebro. La adrenalina es importante en la regulación del despertar, memoria, reacción a los estímulos medioambientales y bienestar (72, 372), jugando un papel muy importante en la ejecución de tareas y en el trastorno por déficit de atención (373, 374). Es posible que un defecto en la producción de adrenalina sea responsable de la alta prevalencia en niños con HSC de alteraciones en el lenguaje, sobre todo en el área de expresión, comprensión y fluidez verbal, así como alteraciones en el aprendizaje (343, 375).

Pacientes con enfermedad de Addison o tras una adrenalectomía bilateral, presentan un aumento compensatorio en la secreción de noradrenalina por un aumento en la actividad del sistema nervioso simpático (355, 376, 377). Sin embargo, esto no lo hemos observado en nuestros pacientes con HSC, lo que refleja que la disminución de la secreción de adrenalina por la médula suprarrenal en pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa puede no ser únicamente por una disminución en la actividad de PNMT, sino en la síntesis de todas las catecolaminas.



### **I.3. DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO**

El hecho de que en nuestro estudio exista una mayor prevalencia de varones que de mujeres en las formas clásicas, en una enfermedad autosómica recesiva donde la relación hombres/mujeres debería ser 1/1, puede deberse a que el Hospital Gregorio Marañón es centro de referencia de la Comunidad Autónoma de Madrid de los pacientes diagnosticados por screening. Acuden por tanto los niños no diagnosticados clínicamente en el periodo neonatal inmediato, generalmente varones, ya que las niñas recién nacidas suelen diagnosticarse al nacimiento por presentar genitales ambiguos y permanecen en su hospital.

Todos los pacientes habían nacido a término y tenían un peso y longitud adecuada para su edad gestacional.

La edad al diagnóstico de los niños detectados por screening es menor que los diagnosticados por clínica compatible, antes de la instauración del programa de detección precoz, o nacidos en otra Comunidad Autónoma o país sin programa de screening. Los pacientes con la forma clínica pierde sal no diagnosticados por screening presentaban alteraciones hidroelectrolíticas potencialmente mortales y algunos se encontraban clínicamente en shock cardiovascular. En nuestro estudio, el programa de detección precoz reduce la edad al diagnóstico, permitiendo detectar niños con HSC antes de la aparición de la crisis de pérdida salina.

Todos los pacientes con déficit clásico de 21-hidroxilasa y los pacientes sintomáticos de las formas no clásicas estaban en tratamiento con glucocorticoides, ya que de esta forma se suprime el exceso de secreción de ACTH y el exceso de producción de andrógenos suprarrenales. La dosis de glucocorticoides de los pacientes con la forma clásica pierde sal y virilizante simple son similares, siendo significativamente mayores que las administradas en los pacientes con formas no clásicas.

La hidrocortisona es el glucocorticoide de elección, ya que su potencia biológica es superponible a la del cortisol endógeno, y además, por su corta vida media tiene menor repercusión sobre el crecimiento y otros sistemas, como el tejido óseo y el metabolismo hidrocarbonado. Las dosis diarias de hidrocortisona recomendadas han ido variando en los últimos años, y hoy se prefiere la administración de dosis ligeramente superiores a la producción endógena de cortisol, que se estima de 6-8 mg/m<sup>2</sup>/día (267), aunque la dosis óptima para un paciente es

aquella dosis mínima eficaz que garantice el equilibrio entre un crecimiento y desarrollo puberal normal con una supresión adecuada de andrógenos suprarrenales (378, 379). El empleo de preparados de glucocorticoides de vida media más prolongada, como prednisona y dexametasona deben ser evitados durante la infancia y la adolescencia por su mayor efecto supresor sobre el crecimiento.

Los pacientes con pérdida salina y aquellos con la forma virilizante simple y elevación de la actividad de renina plasmática requieren la administración de mineralcorticoides. La dosis es significativamente mayor en los pacientes con forma pierde sal, reflejando un mayor déficit de aldosterona. Esta dosis es independiente de la superficie corporal de paciente, aunque son necesarias dosis más elevadas durante el periodo neonatal por una insensibilidad a la acción renal de los mineralcorticoides y una menor actividad de la 21-hidroxilasa extraadrenal (222, 259, 380).

El tratamiento debe ser cuidadosamente monitorizado para evitar tanto las situaciones de sobretratamiento como de infratratamiento, que no conseguirían una supresión andrógena suprarrenal adecuada. Los parámetros clínicos que se valoran son: ausencia de síntomas, normalidad de peso, talla velocidad de crecimiento, maduración ósea y presión arterial. En los parámetros bioquímicos se busca la normalidad hidroelectrolítica y, en pacientes prepuberales, la normalidad de algunos esteroides como DHEA-S o la androstendiona. La 17-OHP es el marcador clásico en el diagnóstico del déficit de 21-hidroxilasa. Sin embargo, esta hormona sufre variaciones circadianas importantes incluso en pacientes que reciben tratamiento con glucocorticoides, y no es un buen marcador para el seguimiento de la enfermedad, aunque la normalización de 17-OHP conduce a un sobretratamiento. ACTH es una hormona hipofisaria que se libera en situaciones de estrés, por lo que tampoco es un buen parámetro para el seguimiento clínico. La androstendiona muestra una variación circadiana menor y es la que presenta una mejor correlación con los criterios de control clínico. Durante la pubertad se recomienda que los niveles plasmáticos de testosterona sean inferiores a 1,5 ng/ml.

El z-score de talla en el momento del estudio es mayor en los pacientes con formas no clásicas respecto a los otros pacientes, con un z-score de pronóstico de talla menor que lo esperado para su talla diana familiar, debido principalmente al retraso en el diagnóstico. La mayoría son pacientes remitidas desde atención primaria por signos precoces de hiperandrogenismo con aceleración de la velocidad de crecimiento y de la edad ósea. Los pacientes con la forma clínica pierde sal y

virilizante simple en el momento del estudio tienen un Z-score talla entre -0,5 y -0,6 con un pronóstico de talla mayor de lo esperado para su talla diana. Este hecho puede ser debido a que en el momento del estudio, la mayoría de los pacientes son peripuberales, siendo la pubertad uno de los momentos donde se pierde más talla. Estudios han mostrado que el estirón puberal es menor en todos los pacientes con formas clásicas, hasta 7 cm menos en las mujeres y 9 cm en los varones, comparándolos con la población de referencia, ya que los glucocorticoides inhiben el pico de IGF-I y GH (324). Otro periodo donde más talla se pierde es durante los primeros dos años de vida, cuando se prescriben mayores dosis de glucocorticoides para conseguir una adecuada supresión de los andrógenos suprarrenales y disminuir el riesgo de sufrir una insuficiencia suprarrenal (381-384).

La mayoría de los pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa alcanzan una talla adulta inferior a la esperada para su potencial genético ( $<-1$  D.S.). No está muy claro cuáles son los factores que contribuyen a ello. Estudios previos han investigado la asociación entre el fenotipo, talla media parental, edad al diagnóstico e inicio de tratamiento, control hormonal y dosis de glucocorticoides, aunque parece que el curso natural de la enfermedad, con hiperproducción de andrógenos y dosis suprafisiológicas de glucocorticoides son los factores que más afectan a la talla final durante la infancia (382, 385-389). Niños con la forma clásica de HSC tienen patrones de secreción de GH más regulares en la pubertad y adolescencia que pacientes control, y esto puede estar asociado a una disminución en la amplitud y/o frecuencia de los pulsos de GH, siendo un factor adicional que comprometa la talla final de estos pacientes.

Se ha sugerido que la variable más importante para mantener una adecuada talla final es la adecuada velocidad de crecimiento (390-392). La talla media de los pacientes con HSC es -1,4 D.E con respecto a la población general (385) aunque otros estudios más recientes presentan tallas finales entre -1,1 y -0,6 D.E en función de la severidad de la enfermedad (382), existiendo una buena correlación con la buena adherencia al tratamiento. El uso de prednisona se ha relacionado negativamente con la talla final.

Debido a que las pautas de tratamiento convencional exponen a la mayoría de los pacientes a un hipercortisolismo, un hiperandrogenismo o a ambos, se continúa buscando alternativas terapéuticas que mejoren el crecimiento y la evolución a largo plazo de estos pacientes. Se están estudiando alternativas médicas terapéuticas al

tratamiento clásico del déficit de 21-hidroxilasa para mejorar la talla final, que incluye cuatro fármacos: dosis bajas de hidrocortisona, junto con 9  $\alpha$ -fluorhidrocortisona a dosis habituales, flutamida (bloqueante del receptor de andrógenos) y testolactona (inhibidor de la actividad de la aromatasas) (274, 275, 393, 394). La progresión del crecimiento longitudinal y de la maduración ósea a los 2 años fue normal. La administración de GHr asociado o no a análogos de GnRH en pacientes con mal pronóstico de talla mejora la velocidad de crecimiento y la predicción de talla final tras dos años de tratamiento (276).

Sin embargo, hasta que no se disponga de mayor información relativa a la seguridad, eficacia y ausencia de efectos sobre la función gonadal a largo plazo, se recomienda no generalizar su empleo.

Se han sugerido otras opciones terapéuticas que buscan mejorar el tratamiento sustitutivo para intentar acercarse a la secreción fisiológica de corticoides. Entre ellos están el bloqueo intraadrenal de la producción hormonal, utilizando la asociación de ketoconazol y dosis bajas de hidrocortisona y 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona. Las formulaciones de hidrocortisona de liberación retardada, como la carbenexolona, que aumenta los valores disponibles de cortisol endógeno, sin efectos secundarios (221, 394-396), o los antagonistas de CRH, como la antalarmina. La suprarrenalectomía laparoscópica bilateral y el tratamiento con dosis fisiológicas de glucocorticoides se ha propuesto como alternativa al tratamiento estándar en pacientes con déficit severo de 21-hidroxilasa y de difícil control (278, 397-401). El principal argumento de los defensores de la adrenalectomía es que se elimina la progresiva virilización. Sin embargo, los riesgos de la anestesia, de la cirugía, la activación del tejido ectópico adrenal y la imposibilidad poder aplicar otras opciones terapéuticas nuevas hacen que este tratamiento esté muy debatido.

#### **I.4. GENOTIPO**

Las mutaciones de 21-hidroxilasa detectadas en nuestros pacientes es el resultado de dos tipos de recombinaciones entre el gen activo CYP21A2 y su pseudogen: la recombinación asimétrica en la meiosis y la conversión génica.

La frecuencia de estas mutaciones es similar a la encontrada en otros estudios (296, 297, 402-405). En nuestros pacientes con la forma clásica pierde sal la mutación más frecuente es la alteración en el procesamiento del intrón 2 (22%)

seguido de largas delecciones y conversiones de genes (20%). La frecuencia del resto de las mutaciones ha sido menor con excepción de la mutación Gln318Stop (17,7%), que se ha presentado con una frecuencia superior a otras poblaciones y delimitada a áreas concretas con marcadores polimórficos idénticos (264, 406, 407). La mutación predominante en las formas virilizante simple es Ile172Asn (30%), seguido de delecciones y conversiones (15%) y Val281Leu (15%). Las formas tardías presentan en general un cambio de aminoácido, siendo la más frecuente Val281Leu (60%) en todas las poblaciones estudiadas (262, 263, 296, 406, 408, 409), seguido de alteración en el procesamiento del intrón2 (20%), y más infrecuentemente heterocigotos compuestos para dos mutaciones leves (Pro30Leu y Pro453Ser).

La actividad funcional que diferentes estudios han detectado de la enzima in vitro está bien correlacionada con el fenotipo (295, 410). El análisis molecular de las alteraciones del gen CYP21A2 permitió clasificar a los pacientes en 4 grupos en función de la actividad enzimática que confiere la enzima 21-hidroxilasa, como nula (grupo 1), mínima (grupo 2), moderada (grupo 3) y leve (grupo 4) como se ha descrito previamente (262, 265, 285, 296, 297, 411). Los heterocigotos compuestos para dos mutaciones diferentes, generalmente se comportan fenotípicamente con la mutación menos grave, ya que deja una actividad residual de la 21-hidroxilasa.

En nuestro estudio, existe una buena correlación genotipo/fenotipo para los pacientes con las mutaciones más severas. Todos los pacientes del grupo 1 y 2 con mutaciones del intrón2 en homocigosis o en heterocigosis compuesta con otra mutación más graves se comportaron como formas clásicas pierde sal.

Todos los pacientes del grupo 3 presentan un fenotipo virilizante simple, excepto un paciente que presentaba una mutación en heterocigosis compuesta de Arg426His y Ile172Asn + Val281Leu y clínicamente era una forma pierde sal. La mutación Arg426His es una mutación asociada a formas clásicas pierde sal o virizante simple (412, 413). La correlación genotipo/fenotipo para el grupo 3 es algo menor que para las formas más graves.

Los pacientes del grupo 4 presentan en su mayoría formas tardías de la enfermedad, excepto dos que estaban asintomáticos en el momento del estudio y otros tres casos que eran formas virilizante simple. Estos cinco últimos casos fueron diagnosticados por screening y aunque las dos formas crípticas no han tenido signos de hiperandrogenismo, son pacientes todavía jóvenes y pueden tener alguna manifestación más tardíamente. Los otros tres niños con forma virilizante simple se

comportan clínicamente más leves que los otros cuatro pacientes con el mismo fenotipo, ya que son los únicos de este grupo que no han precisado tratamiento con mineralcorticoides, mostrando que la síntesis de aldosterona está intacta. Presentan mutaciones leves Val281Leu, Pro453Ser y Asp287Hys en heterocigosis compuesta con mutaciones más graves, como son Arg356Trp, Ile172Asn y Pro30Leu. Esta última mutación puede comportarse como moderada-severa (222).

Estudios previos sugieren que existe una alta concordancia entre el genotipo y el fenotipo en las formas más graves y en las más leves de la enfermedad, pero la correlación fenotipo-genotipo es peor en los pacientes con formas moderadas (262, 296, 297, 402, 414) por mecanismos todavía no bien conocidos (266, 415-418). Algunos pacientes con mutaciones graves clínicamente no tienen crisis de pérdida salina (405, 408, 419). Esta discordancia de la correlación genotipo-fenotipo se ha atribuido a una actividad variable en las mutaciones en el Intrón2 y de Ile172Asn, de forma que la alteración del intrón2 en ocasiones aminora el déficit enzimático en algunos pacientes, y la mutación Ile172Asn en ocasiones no tiene la suficiente actividad 21-hidroxilasa residual para prevenir las crisis de pérdida salina (414). Otros pacientes tienen una mutación en heterocigosis compuesta con otras mutaciones que comprometen la actividad enzimática de forma variable, de forma que la combinación de esas dos mutaciones in vivo no tiene la actividad enzimática esperada para cada una de las mutaciones en homocigosis (296, 414). Por ello, heterocigotos para una mutación clásica y no clásica tienen niveles de 17OHP mayores que homocigotos para mutaciones no clásicas (420). Pueden existir también mutaciones no identificadas todavía, diferente sensibilidad a los glucocorticoides o a variaciones genéticas en la actividad extraadrenal de 21-hidroxilasa (259, 421-425).

La 21-hidroxilación extraadrenal puede modificar el cuadro clínico de pacientes con HSC y mutaciones de CYP21A2 equivalentes. Esto se deriva de la observación clínica de que algunos pacientes que han tenido episodios pierde sal recuperan la capacidad de sintetizar una cantidad suficiente de mineralcorticoides para evitar las crisis en la edad adulta, no se observa la misma concordancia clínica en pacientes con la forma pierde sal HLA-identícos y que los padres portadores de mutaciones severas no muestran un déficit parcial de aldosterona (426). Esta variación puede consistir en la 21-hidroxilación extraadrenal de la progesterona a deoxicorticosterona, pero no 17-OHP a 11-deoxicortisol, aminorando el déficit de mineralcorticoides, pero no de glucocorticoides (380, 427-429), o que como se

necesitan para actuar 100 veces menos de mineralcorticoides que de glucocorticoides, y la 21-hidroxilación extraadrenal es menos efectiva que la adrenal, la poca hidroxilación puede tener un efecto en el metabolismo mineral. Los pacientes con déficit de adrenalina en orina presentan niveles de aldosterona en sangre significativamente menores que aquellos con adrenalina. Como la aldosterona aumenta la síntesis de dopamina mediante la activación de la tirosina hidroxilasa, podría también aumentar la síntesis de adrenalina por mecanismos todavía desconocidos.

## **II.-COMPARACIÓN CON ESTUDIOS PREVIOS**

Esta disfunción medular en pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa concuerda con estudios previos, donde las concentraciones basales de adrenalina y metanefrinas en plasma y adrenalina en orina son cuantitativamente menores que en sujetos sanos. Cuando se comparan pacientes con fenotipo pierde sal con virilizante simple, sólo se observan diferencias en los niveles de metanefrinas en sangre (285).

Merke et al fueron los primeros autores en el año 2000 en describir que pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa presentan alteraciones en el desarrollo y en la funcionalidad de la glándula suprarrenal, tanto de la corteza como de la médula (286). Evaluaron la función medular en 38 pacientes, 25 con fenotipo pierde sal y 13 virilizante simple comparándola con 39 pacientes sanos y 3 pacientes con HSC a los que se había realizado adrenalectomía bilateral por un difícil control del hiperandrogenismo. Observaron que los pacientes con HSC con forma clásica pierde sal, virilizante simple y los adrenalectomizados tenían niveles menores de adrenalina, metanefrinas en sangre y de adrenalina en orina cuando se compararon con los sujetos sanos. Los pacientes adrenalectomizados tenían niveles de noradrenalina y excreción urinaria de noradrenalina mayor que los sujetos sanos, mientras que los pacientes con HSC no tenían elevadas la noradrenalina en plasma ni en orina. Encontraron que los pacientes con déficit de 21-hidroxilasa tenían una dismundición medular, caracterizada por una disminución en la producción de adrenalina, metanefrinas y normetanefrinas.

El estudio histológico de los 3 pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa que habían sido adrenalectomizados muestran una hiperplasia adrenocortical con cambios estructurales en la médula, caracterizada por displasia,

una reducida expresión de la tirosina hidroxilasa y la depleción de vesículas que contienen adrenalina. Existe una pobre diferenciación de las tres zonas de la corteza, con una zona glomerular irregular, células fasciculadas que llegan hasta la cápsula, y un aumento del intermedio entre la corteza y la médula. Estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos anti-tirosina hidroxilasa muestran una marcada disminución de esta enzima en los islotes de células cromafines (286).

A nivel de microscopía electrónica, las células normales de la corteza suprarrenal contienen abundante retículo endoplásmico liso, con una estructura normal mitocondrial caracterizada por crestas alargadas en las células de la glomerulosa y crestas redondeadas en las células reticulares. En pacientes con déficit de 21-hidroxilasa, la zona glomerular es irregular y las células están caracterizadas por tener abundante citoplasma, con aumento del retículo endoplásmico liso, y mitocondrias alargadas y redondeadas con la membrana interna muy fina. Las células cromafines se presentan ultraestructuralmente como células neuroendocrinas, con una gran membrana que rodea vesículas secretoras y de aproximadamente 50-450 nm de diámetro máximo. Existen dos tipos de vesículas: las grandes y redondas, que contienen adrenalina, y las pequeñas, que contienen noradrenalina. Las células cromafines presentan vesículas vacías, y las pocas que hay contienen noradrenalina. Además, las células cromafines están frecuentemente entremezcladas con la corteza suprarrenal (286).

Modelos animales han permitido realizar también un análisis morfológico y estructural de los cambios que se producen en las glándulas suprarrenales por el déficit de 21-hidroxilasa similares a la suprarrenal humana. Aparte de las células cromafines de la médula suprarrenal que provienen de las células precursoras de la cresta neural, y que migran al primordio adrenal bajo la influencia de los glucocorticoides, existe un tercer tipo de células llamadas SIF (small intensely fluorescente). Las células SIF tienen características intermedias entre las neuronas y las células cromafines, reflejando la plasticidad de las células cromafines y la importancia de factores que están involucrados en el desarrollo de la cresta neural (430, 431). El fenotipo de las células cromafines de ratones con déficit de 21 hidroxilasa es semejante a las células SIF, con formación de pequeñas neuritas, con un gran retículo endoplásmico rugoso, menos vesículas de almacenamiento y una disminución de los depósitos de catecolaminas (284).



Charmandari et al. evaluaron también en el año 2002 la función medular de 38 pacientes, siendo 28 formas pierde sal y 9 virilizante simple. Los niveles de metanefrinas en plasma fueron significativamente menores en los pacientes con el fenotipo pierde sal que en los virilizante simple, mientras que las diferencias de los niveles plasmáticos y urinarios de adrenalina no eran significativos, reflejando una disminución de los depósitos de catecolaminas en la médula suprarrenal de las formas más severas de la enfermedad. Cuando relacionaron el genotipo con los niveles de metanefrinas en sangre observaron una correlación con la severidad de la actividad que confiere CYP21, de manera que las formas más severas tienen menos metanefrinas, y éstas van aumentando a medida que disminuye la gravedad de la actividad de 21-hidroxilasa. La medición de metanefrinas libres en plasma es el mejor parámetro para la evaluación de la función medular, siendo un marcador muy útil en la severidad clínica del déficit de 21-hidroxilasa. Las metanefrinas libres en plasma pueden predecir el fenotipo.

Weise M. et al. evaluaron la reserva adrenomedular durante el ejercicio físico intenso en 9 pacientes con HSC comparándolos con 9 pacientes sanos (287). Mostraron que pacientes con HSC tienen una marcada disminución de la adrenalina y menos de la noradrenalina durante el estrés, sin diferencias en la tensión arterial sistólica, diastólica pero una menor frecuencia cardíaca, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, carecen de la normal elevación de glucemia inducida durante el ejercicio siendo debido probablemente al déficit de adrenalina (432). El ejercicio induce cambios en las hormonas contrarreguladoras, la insulina, el glucagón y GH, siendo estos cambios similares en ambos grupos. La adrenalina suprime la insulina y puede mejorar la secreción de glucagón durante el ejercicio, por lo que es esperable que el déficit de adrenalina en pacientes con HSC produzca un aumento de insulina y disminución de glucagón. Sin embargo, tras el ejercicio, los niveles de insulina eran similares en ambos grupos, a pesar de la diferencia de la glucemia, lo que sugiere que la insulina es mayor en pacientes con HSC para el grado de glucemia. Se ha especulado que en el caso de hipoglucemia, la respuesta del glucagón y la GH puede estar elevada para compensar el déficit de adrenalina. Sin embargo, la adrenalina es la hormona contrarreguladora de acción más rápida, por lo que puede existir un periodo prolongado de déficit de glucosa (433). Pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa presentan un aumento compensatorio de noradrenalina durante el estrés (341), pero no se han visto

diferencias en la noradrenalina basal (286). El déficit congénito de cortisol y consecuentemente de adrenalina, como es el caso de la HSC, puede ejercer efectos en el sistema nervioso simpático diferentes de los que se observa en los pacientes con déficit adquirido de cortisol y adrenalina.

Este mismo grupo evaluó si la administración en 9 pacientes con HSC de una dosis extra de glucocorticoides previo al ejercicio moderado-intenso era beneficiosa comparándolas con otro grupo de 9 pacientes sanos de similares características en edad, altura e IMC. Los pacientes con HSC recibían su dosis habitual de hidrocortisona y fludrocortisona una hora previa al ejercicio. Además, se les administraba placebo o una dosis extra de hidrocortisona, según el ensayo doble ciego. No se vieron diferencias en los niveles de glucosa, adrenalina, noradrenalina, glucagón, insulina, GH, duración del ejercicio y tensión arterial entre los pacientes a los que se administró una dosis extra de hidrocortisona de los que no, mientras que sí se observaron diferencias en la frecuencia cardíaca, aunque fueron mínimas. Concluyeron que la administración de una dosis extra de glucocorticoides previo al ejercicio intenso no influye en la tolerancia al mismo, siendo la respuesta cardiorrespiratoria similar en los pacientes que no tomaron dosis extra.

Todos los estudios ponen de manifiesto que los pacientes con HSC tienen disfunción medular, caracterizada por un déficit en la producción de catecolaminas, afectando sobre todo a la producción de adrenalina. Esta disfunción es mayor en las formas pierde sal que en las virilizante simple, reflejando una concordancia entre los depósitos de catecolaminas y la severidad clínica de la enfermedad.

En humanos, más del 90% de la adrenalina circulante es liberada directamente a la sangre por la médula suprarrenal, pudiendo aumentar su secreción hasta 300 veces tras un factor estresante. La O-metilación de la adrenalina y noradrenalina en las vesículas del citoplasma de las células cromafines da lugar a más del 90% de la metanefrina y más del 40% de la normetanefrina circulante respectivamente (72, 377). Por ello, la disminución de metanefrinas en refleja los depósitos de adrenalina y noradrenalina, mientras que la disminución de adrenalina en plasma u orina refleja la secreción adrenomedular (286).

En todos los estudios anteriores, el parámetro que mejor refleja la disfunción adrenomedular es la disminución de metanefrinas en plasma y orina. La medición de adrenalina en orina no ha sido un buen parámetro analítico para discriminar las distintas formas clínicas. Sin embargo, ningún estudio ha realizado una comparación

de las formas clínicas más graves, caracterizadas por presentar descompensaciones clínicas antes situaciones de estrés, a pesar de un buen cumplimiento terapéutico con gluco y mineralcorticoides con el resto de las formas clínicas. El hecho que todos los pacientes de nuestro estudio con más crisis adrenales tengan déficit de adrenalina en orina sugiere que es un parámetro menos sensible pero más específico en la detección de disfunción adrenomedular.

### **III.-LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

En nuestro estudio hemos obtenido de cada paciente una muestra de orina de 24 horas para valorar el grado de afectación medular.

La principal ventaja de la medición en orina con respecto a la sanguínea es que es una técnica de fácil acceso por todos los profesionales. Además, puede realizarse fácilmente con un mínimo coste y esfuerzo, el análisis es sencillo con bajas concentraciones de orina (200-2000nm) y es una técnica de determinación de catecolaminas libres en orina es una técnica bien establecida utilizada ya para la detección de tumores secretores. Los problemas potenciales de esta técnica derivan de la dificultad de su recogida en niños pequeños, establecer los intervalos de referencia para este grupo de pacientes, la dificultad en la interpretación si la recogida no es de 24 horas y no ser apropiado para los pacientes con insuficiencia renal.

La obtención de muestras de catecolaminas en sangre, aunque es una técnica más sensible y específica, tiene varios inconvenientes, siendo el principal de ellos que no son adecuados para aplicar en la rutina del laboratorio clínico, además de ser una técnica de difícil acceso para el profesional. Es muy difícil de cuantificar exactamente las concentraciones mínimas de noradrenalina, adrenalina y dopamina en plasma, ya que las concentraciones de adrenalina en plasma presentan variaciones circadianas, con valores mayores durante la mañana y menores durante el día, y su liberación es muy variable en función del sexo, edad, IMC, estadio puberal, actividad física y estrés (95, 434). Los métodos de colección, transporte y medición son bastante complejos y tediosos requiriendo una atención minuciosa. Aunque las catecolaminas poseen fluorescencia natural, existen muchos otros compuestos y drogas presentes en el plasma que tienen una absorción y emisión máxima a la misma longitud de onda y por lo tanto requieren técnicas de aislamiento altamente

específicas. La extracción de sangre es más estresante para el niño, sobre todo este grupo de pacientes que están sometidos a múltiples análisis. Entre las principales ventajas es que puede ser utilizado en un paciente con insuficiencia renal y los rangos de referencia en el niño están mejor establecidos.

En nuestro laboratorio no disponemos de la medición de catecolaminas en sangre ni de metanefrinas en orina, técnicas muy útiles que podrían haber completado el estudio tanto de la reserva como de la secreción medular.

Nuestro estudio evalúa retrospectivamente las crisis de descompensación recogiendo información de los informes de urgencias de los pacientes que fueron atendidos en nuestro hospital a partir de 2004, por lo que no pudimos recopilar informes de todos los episodios de descompensación. La realización de un estudio prospectivo donde se evalúe parámetros clínicos como estado general, temperatura, tensión arterial, frecuencia cardíaca, y analíticos como glucemia, iones, cortisol y otros andrógenos suprarrenales en momento de la descompensación, podría ayudar a caracterizar mejor estas descompensaciones.

El déficit de adrenalina puede ser responsable del riesgo de desarrollar hipoglucemia en niños con HSC durante enfermedades intercurrentes, pero son necesarios más estudios donde se valore si es necesaria la suplementación con carbohidratos y glucosa ante situaciones de estrés o el ejercicio intenso.

#### **IV.-CONCLUSION**

Este estudio sugiere que algunos pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa no sólo presentan un déficit de cortisol sino también una disfunción adrenomedular, caracterizada por un déficit en la producción de adrenalina (285). Este hecho se correlaciona con la observación en la práctica clínica de que hay pacientes con la forma clásica pierde sal que presentan numerosos episodios de descompensación. Son pacientes con el fenotipo más severo dentro de las formas pierde sal, que han tenido numerosas descompensaciones a pesar de un adecuado tratamiento con glucocorticoides y mineralcorticoides, precisando un gran número de asistencias a servicios de urgencias y hospitalizaciones.

En nuestro estudio, la medición de catecolaminas en orina está bien correlacionada con la gravedad clínica de la enfermedad, con el fenotipo y con la actividad esperada de la 21-hidroxilasa según el análisis genético molecular.

Los pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa no pueden producir suficiente cortisol ante una situación de estrés, siendo necesario aumentar la dosis de hidrocortisona durante episodios como fiebre, vómitos, cirugía o traumatismos (435). Las guías recomiendan doblar o triplicar la dosis de hidrocortisona durante un periodo de dos o tres días. Ante una cirugía, traumatismo o aquellos que no toleren la medicación vía oral, puede administrarse intramuscular, aunque probablemente necesitará la canalización de una vía para la administración de líquidos intravenosos. En casos de cirugía mayor, se debe administrar hidrocortisona intravenosa (435, 436).

Sin embargo, las situaciones de estrés inducen la elevación en plasma de cortisol y de adrenalina, produciendo un aumento en la frecuencia cardíaca, tensión arterial y la activación de otras vías metabólicas como la lipólisis, cetogénesis, termogénesis y glicolisis.

Pacientes con HSC no sólo no pueden sintetizar cortisol, sino que también tienen un defecto en la formación de la médula adrenal, con un déficit en la producción y en los depósitos de adrenalina y sus metabolitos. El tratamiento convencional con glucocorticoides y mineralcorticoides no reemplaza la alteración del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal ni el sistema adrenomedular, por lo que deben ensayarse nuevas estrategias terapéuticas.

Se ha ensayado terapia génica utilizando como modelos de ratones con déficit de 21-hidroxilasa. Cuando se transfiere un fragmento de DNA recombinante que contiene el genoma murino de CYP21A2 a ratones con déficit de 21-hidroxilasa, el 15% sobrevivieron con glucocorticoides, mientras que el 80% con la terapia génica (284, 437).

Cuando se transfiere un vector de un adenovirus a la secuencia genómica del gen CYP21A2 de ratones homocigotos para mutaciones de la 21-OH producen la expresión del RNAm de CYP21 y actividad hidroxilasa en la glándula adrenal, se restaura la síntesis de corticosterona en la glándula suprarrenal, así como la zonificación de la glándula y la ultraestructura de las mitocondrias. Además, se corrigen las anomalías de la médula, la secreción de catecolaminas por los gránulos cromafines y la expresión de PNMT. Los vectores de los adenovirus casi no inducen respuesta inflamatoria en la glándula adrenal, sugiriendo que las altas concentraciones de glucocorticoides suprimen la respuesta inmune (291, 438).

Sin embargo, se necesitan el desarrollo de nuevos vectores, probablemente vectores retrovirales que permitan una integración del genoma más estable en el tiempo, con promotores adrenales específicos para poder garantizar, mejorar la eficacia y duración de la terapia génica en pacientes con HSC.

Con estos avances, la terapia génica puede ser una buena opción terapéutica en estos pacientes.

## **CONCLUSIONES**

- Algunos pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa con la forma clásica pierde sal presentan no sólo déficit de mineralocorticoides y glucocorticoides como resultado de la afectación del eje hipotálamo-hipofisis-suprarrenal y del sistema renina-angiotensina-aldosterona, sino que también tienen comprometido el sistema adrenomedular. Esta disfunción adrenomedular está caracterizada por un déficit en la secreción de adrenalina. Existen otros pacientes con la forma clásica pierde sal, la forma virilizante simple y las formas no clásicas que no presentan disfunción adrenomedular.
- La evaluación de la función adrenomedular puede ser útil para predecir la gravedad de la enfermedad, ya que los pacientes con fenotipo pierde sal y con déficit de adrenalina han presentado numerosas descompensaciones cuando se compara con los pacientes con fenotipo pierde sal y sin déficit de adrenalina.
- Pacientes con fenotipo pierde sal y disfunción adrenomedular tienen una menor producción endógena de cortisol y aldosterona que los pacientes con fenotipo pierde sal sin disfunción adrenomedular, precisando comparativamente dosis mayores de glucocorticoides pero no de mineralocorticoides. No se observaron diferencias en el peso, talla, IMC ni pronóstico de talla entre ambos grupos, aunque la talla y el pronóstico de talla es menor en los pacientes con disfunción adrenomedular.
- La evaluación de la función medular puede ser útil para predecir las formas genéticas más graves. Pacientes con déficit de adrenalina en orina son aquellos que tienen alteraciones genéticas que impiden la actividad de 21-hidroxilasa. En nuestro estudio, la alteración en el procesamiento del RNAm del intrón 2 en heterocigosis compuesta con una mutación más severa de CYP21A2 se han comportado fenotípica y clínicamente como mutaciones severas.
- La medición de adrenalina en orina es una técnica sencilla, de fácil acceso, bien establecida y con un mínimo coste que permite evaluar con una alta



especificidad la función medular en pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa.

- Las descompensaciones clínicas se caracterizan por tensión arterial normal, sin taquicardia a pesar de la fiebre, iones normales y sin elevación de la glucemia. Esto sugiere un defecto en la regulación neuroadrenocortical que puede contribuir a una mala adaptación al estrés en estos pacientes. El hecho de que la mayoría de los pacientes hubieran duplicado ya la dosis de hidrocortisona antes de acudir al servicio de urgencias, y que a pesar de ello presentaran una descompensación clínica, implica que tanto el tratamiento convencional con glucocorticoides y mineralcorticoides, como duplicar la dosis de glucocorticoides durante el estrés no son suficientes para aumentar la síntesis de adrenalina intraadrenal.
- Los dos sistemas endocrinos forman una unidad funcional y la alteración de uno de ellos puede tener efecto en el otro. La alteración de la médula suprarrenal debe tenerse en cuenta en el manejo clínico de la enfermedad. Ante situaciones de estrés o el ejercicio intenso, la suplementación con carbohidratos y glucosa puede ser necesaria, mientras que las nuevas medidas terapéuticas deberían ir encaminadas a la restauración de este déficit (terapia génica).
- Existe una buena relación genotipo-fenotipo. La mejor correlación (el 100%) se encuentra en las mutaciones más graves, aquellas que impiden la actividad enzimática de 21-OH y las formas moderadas. Se observó una menor concordancia en los pacientes con mutaciones más leves, ya que 3 de ellos eran formas virilizante simple en lugar de las formas esperadas, tardías o crípticas. No obstante, eran los únicos pacientes de este fenotipo que no presentaron una depleción crónica de sodio, por lo que no fueron tratados con mineralcorticoides.
- Todos los pacientes con HSC por déficit de 21-hidroxilasa de nuestro estudio presentan una talla, peso e IMC que se ajusta a la normalidad. Pacientes con formas no clásicas son significativamente más altos que los pacientes con la

forma clásica pierde sal y virilizante simple, aunque no se observaron diferencias en el pronóstico de talla. En la actualidad, el pronóstico de talla es acorde a su talla diana y dentro de la normalidad. Sin embargo, dado que muchos pacientes son prepuberales, este dato debe ser tomado con precaución y reevaluarse cuando alcancen la talla adulta.

- Los pacientes con formas clásicas reciben tratamiento con glucocorticoides y mineralcorticoides. No existen diferencias en las dosis de glucocorticoides entre los pacientes con fenotipo pierde sal y virilizante simple a pesar de una menor producción endógena de cortisol y una mayor supresión de los andrógenos suprarrenales, mientras que sí se observaron diferencias en la dosis de mineralcorticoides, debido a una menor producción de aldosterona.

## **BASE DE DATOS**

Tabla 27. Datos auxológicos en el momento del estudio

	Dx	Varón/ mujer	Edad (años)	Talla (cm)	Z score talla	Peso (kg)	Z score peso	IMC(kg/m2)	Z score IMC	T. diana	Z score T. diana	E.O	Z talla para EO	P. talla	Z score P. talla
1	PS	Mujer	12,19	143,5	-1,3	34	-1,3	16,51	-0,93	162,78	-0,17	10	0,79	164,19	0,06
2	PS	Mujer	4,19	101,6	-0,76	17	-0,21	16,47	0,39	161,28	-0,41	2,6	2,5		
3	PS	Mujer	26,03	163	-0,13	52,9	-0,63	19,91	-0,62	159,28	-0,74	---	----	163	-0,13
4	PS	Mujer	19,9	159	-0,78	56,5	-0,14	22,35	0,36	156,78	-1,14	---	----	159	-0,78
5	PS	Mujer	7,10	121	-0,46	33,8	2,06	23,09	3,1	160,78	-0,49	6	0,88	165,08	0,2
6	PS	Mujer	8,03	127,5	-0,32	27	-0,43	16,61	-0,35	170,78	1,13	6	2,3	173,94	1,64
7	PS	Varón	9,72	132,5	-1,1	32	-0,59	18,23	-0,13	175,22	-0,18	7,5	1,07	179,5	0,57
8	PS	Varón	3,01	93	-1,1	13,5	-0,96	15,61	-0,43	177,72	0,25	3	-1,08		
9	PS	Varón	8,07	134	0,75	40,01	2,16	22,33	2,24	187,72	2,01	8	0,82	185,34	1,59
10	PS	Varón	3,58	95	-1,23	13,5	-1,13	14,96	-0,83	D.O.		2,8	0,15	177,47	0,21
11	PS	Varón	1,3	78	-0,57	9,5	-1,5	15,61	-1,44	181,72	0,96	1,5	-0,54		
12	PS	Varón	5,03	115	0,9	20,2	0,06	15,27	-0,49	175,22	-0,18	5	0,98		
13	PS	Varón	16,25	168	-0,94	93,5	2,27	33,13	3,33	174,72	-0,27	16	-0,75	171,08	-0,91
14	PS	Varón	14,6	157,7	-0,97	59,6	0,11	23,97	0,88	172,72	-0,62	13	0,09	179,2	0,5
15	PS	Varón	2,99	96,5	0,06	17,2	1,42	18,47	1,97	192,22	2,8	2,6	1,29		
16	PS	Varón	17,37	174	-0,35	62	-0,73	20,48	-0,68	170,47	-1,02	17	-0,28	175,58	-0,12
17	PS	Varón	2,96	93	-0,99	15	0,05	17,34	1	167,7	-1,5	2,5	0,41		
18	PS	Varón	2,40	91,2	0,02	13,8	-0,02	16,59	-0,02	174,72	-0,27	3	-1,67		
19	PS	Varón	7,05	119	-1,07	21,5	-1,29	15,18	-0,91	169,72	-1,15	6	0,4	175	-0,22
20	PS	Varón	3,8	101	-0,5	20	0,96	19,61	2,07	174,72	-0,27	3,5	0,37		
21	PS	Varón	13,39	161	0,11	57	0,44	21,99	0,57	176,72	0,08	0,45	1,58	183,79	1,32
22	VS	Mujer	20,72	156	-1,27	54	-0,48	22,19	0,3	163,78	-0,01	---	----	156	-1,27
23	VS	Mujer	10,40	145,7	0,38	36,9	-0,2	17,38	-0,43	Padre des		12,5	-1,07	157,68	-1

	Dx	Varón/ mujer	Edad (años)	Talla (cm)	Z score talla	Peso (kg)	Z score peso	IMC (kg/m2)	Z score IMC	T. diana	Z score T. diana	E.O	Z talla Para EO	P. talla	Z score P. talla
24	VS	Varón	4,78	104	-1,6	20,6	0,35	19,42	1,89	168	-1,46	6	-2,88	178,45	0,38
25	VS	Varón	3,11	92	-1,49	14,9	-0,22	17,6	1,05	168	-1,46	3	-1,41		
26	VS	Varón	3,2	94	-0,99	16,8	0,6	19,01	1,89	169,7	-1,15	3	-0,76		
27	VS	Varón	5,09	108	-0,83	20,8	0,19	17,83	0,87	172,22	-0,71	5	-0,67		
28	VS	Varón	3,58	96	-0,98	14,7	-0,69	15,95	-0,27	180,22	0,69	3,5	-0,76		
29	VS	Varón	10,6	153	1,63	50,2	1,26	21,44	0,73	181,72	0,96	12	0,42	189,12	2,26
30	NC	Mujer	10,24	143	0,23	40	0,36	19,56	0,36	154,78	-1,47	12	-1,32	158,71	-0,83
31	NC	Mujer	9,06	128	-1,16	27,4	-0,89	16,72	-0,51	162,78	-0,17	10	-1,77	148,49	-2,49
32	NC	Mujer	10,12	138	-0,34	31,5	-0,81	16,52	-0,86	162,78	-0,17	10	-0,1	160,21	-0,59
33	NC	Mujer	10,7	147	0,3	55	1,97	25,45	2,28	153,78	-1,63	12	-0,75	163,15	-0,11
34	NC	Mujer	11,79	149	-0,34	65	2,93	29,28	4,25	161,28	-0,41	14	-1,92	153,29	-1,71
35	NC	Mujer	9,34	144	1,45	33,8	0,17	16,3	-0,53	174,78	1,77	11,5	-0,91	161,62	-0,36
36	NC	Mujer	10,21	147	0,95	40,5	0,46	18,74	0,04	154,78	-1,47	13,5	-1,83	152,651	-1,81
37	NC	Mujer	8,42	139,5	1,58	36,2	1,28	18,6	0,58	164,78	0,15	10	0,13	168,48	0,75
38	NC	Mujer	9,52	144	1,38	35,3	0,4	17,02	-0,2	161,28	-0,41	11	-0,34	163,08	-0,12
39	NC	Mujer	9,54	141	0,78	36	0,5	18,11	0,19	161,28	-0,41	10	0,37	163,57	-0,04
40	NC	Varón	12,67	158,5	0,44	40,5	-0,85	16,12	-1,39	175,22	-0,18	13,5	-0,3	175,72	-0,1
41	NC	Varón	3,79	96,5	-1,27	16	-0,41	17,18	0,5	164,72	-2,03	3	0,05		
42	C	Mujer	9,03	128	-1,13	26,1	-1,11	15,93	-0,88	162,78	-0,17	9	-1,09	154,78	-1,47
43	C	Varón	8,91	134	0,06	27,1	-0,92	15,09	-1,24	177,72	0,25	7,5	1,34	181,57	0,93

**IMC:** índice de masa corporal

**T. diana:** talla diana

**E.O:** edad ósea (Greulich&Pyle)

**P.Talla:** pronóstico de talla

*En cursiva tallas finales*

**Tabla 28. Fenotipo, genotipo, n° de descompensaciones y niveles de catecolaminas en orina**

	Dx	Edad (años)	Genotipo (alelo materno/paterno)	N° Descompensaciones	Adrenalina		Noradrenalina		Dopamina	
					(µgr/24h)	DE	(µgr/24h)	DE	(µgr/24h)	DE
1	PS	12,19	Conversión del gen/655G	12	<2	No	22	-1,54	Si	168
2	PS	4,19	655G/Gln318Stop	11	<2	No	11	-0,36	Si	198
3	PS	26,03	Arg426His/Ile172 Asn-Val281Leu	0	2	N	17	N	Si	136
4	PS	19,9	Gln318Stop/Gln318Stop	0	4	N	14	N	Si	206
5	PS	7,10	Delección 8pb-Val281Leu/Delección del gen	0	3	-0,50	12	-1,49	Si	162
6	PS	8,03	306Inst-Val281Leu/655G-Delección8pb	0	2	-0,95	14	-1,14	Si	266
7	PS	9,72	Conversión del gen/655G	11	<2	No	59	6,75	Si	453
8	PS	3,01	Arg356Trp/Gln318Stop	12	<2	No	12	0,89	Si	90
9	PS	8,07	655G/Delección del gen	2	6	0,86	26	0,96	Si	220
10	PS	3,58	Gln318Stop-Arg356Trp/Gln318Stop	10	<2	No	52	8,36	Si	425
11	PS	1,3	Gln318Stop/Val281Leu-655G	11	<2	No	5	-0,70	Si	93
12	PS	5,03	655G/655G	0	3	0,67	20	1,55	Si	181
13	PS	16,25	Arg356Trp/655G-Delección8pb	4	4	N	32	N	Si	297
14	PS	14,6	Ile172Asn-Gln318Stop/Arg356Trp	0	4	-0,50	23	-1,39	Si	147
15	PS	2,99	655G-Delección8pb/655G	8	<2	No	29	N	Si	191
16	PS	17,37	655G-Val281Leu/Conversión del gen	9	<2	No	28	N	Si	679
17	PS	2,96	306Inst/655G-Delección8pb	0	2	0,00	19	2,48	Si	154
18	PS	2,40	655G-Delección8pb/Conversión del gen	13	<2	No	12	0,89	Si	197
19	PS	7,05	655G/Delección del gen funcional	9	<2	No	30	1,67	Si	164
20	PS	3,8	655G/Val281Leu-306Inst	11	<2	No	4	-1,85	Si	81
21	PS	13,39	306Inst-Val281Leu/Arg356Trp	3	19	8,88	93	8,75	Si	315
22	VS	20,72	Ile172Asn/655G	0	8	N	49	N	Si	202
23	VS	10,40	Ile172Asn-Val281Leu/Gln318Stop	0	6	0,75	40	1,07	Si	299
24	VS	4,78	Ile172Asn/655G-Delección8pb	0	4	1,78	10	-0,57	Si	96

	Dx	Edad (años)	Genotipo (alelo materno/paterno)	N° Descompensaciones	Adrenalina		Noradrenalina		Dopamina				
					(µgr/24h)	DE	(µgr/24h)	DE	(µgr/24h)	DE			
25	VS	3,11	Ile172Asn/655G-Delección8pb	0	3	0,67	Si	16	0,70	Si	174	0,20	Si
26	VS	3,2	Arg356Trp/Val281Leu	0	3	0,67	Si	21	1,77	Si	137	-0,46	Si
27	VS	5,09	Pro453ser/Pro30leu	0	2	-0,44	Si	16	0,70	Si	94	-1,23	Si
28	VS	3,58	Ile172Asn/Asp287Hys	0	10	8,44	Si	23	2,19	Si	250	1,55	Si
29	VS	10,6	Ile172Asn/Delección del gen	0	3	-1,13	Si	19	-1,97	Si	255	-0,66	Si
30	NC	10,24	Val281Leu/Val281Leu	0	4	-0,05	Si	48	2,23	Si	330	0,68	Si
31	NC	9,06	Val281Leu/Ile172Asn	0	2	-0,95	Si	20	-0,09	Si	218	0,24	Si
32	NC	10,12	Ile172Asn/Val281Leu	0	7	5,11	Si	34	2,37	Si	210	0,14	Si
33	NC	10,7	655G/Val281Leu	0	4	-0,50	Si	41	1,22	Si	336	0,79	Si
34	NC	11,79	Val281Leu/655G	0	8	2,00	Si	29	-0,52	Si	236	-1,00	Si
35	NC	9,34	Pro30Leu/Val281Leu	0	5	0,41	Si	19	-0,26	Si	196	-0,05	Si
36	NC	10,21	655G-Val281Leu/Pro453Ser	0	4	-0,50	Si	26	-0,96	Si	244	-0,86	Si
37	NC	8,42	655G/Val281Leu	0	3	-0,50	Si	15	-0,96	Si	195	-0,07	Si
38	NC	9,52	Val281Leu/Val281Leu	0	5	0,41	Si	16	-0,79	Si	136	-0,86	Si
39	NC	9,54	Val281Leu/Val281Leu	0	8	1,77	Si	18	-0,44	Si	265	0,88	Si
40	NC	12,67	Val281Leu/Ile172Asn	0	6	0,75	Si	37	0,64	Si	327	0,63	Si
41	NC	3,79	655G/Val281Leu	0	3	-0,50	Si	14	0,28	Si	133	-0,54	Si
42	C	9,03	Delección 8pb/Val281Leu	0	4	-0,05	Si	12	-1,49	Si	126	-1,00	Si
43	C	8,91	Ile172Asn/Val281Leu	0	9	2,63	Si	36	2,72	Si	304	1,41	Si

Tabla 29. Datos al diagnóstico

	Dx	Varón/ mujer	Edad estudio (años)	Modo de diagnóstico	Edad de Dx	17OHP (nmol/l)	17- OHP (ng/ml)	17-OHP (ng/ml) 60´	Virilización	Edad inicio tratamiento	Cirugía correctora (edad)
1	PS	Mujer	12,19	Prenatal, screening	Prenatal	700	311	--	Prader I (tratam prenatal)	5 días	No
2	PS	Mujer	4,19	Screening	9 días	680	--	--	Prader V (asignación incorrecta de sexo)	9 días	6meses y 2 años
3	PS	Mujer	26,03	Deshidratación	Neonatal	--	--	--	Prader II-III	Neonatal	3 y 14 años
4	PS	Mujer	19,9	Genitales ambiguos	10 días	--	--	--	Prader IV	10 días	10meses y 11 años
5	PS	Mujer	7,10	Genitales ambiguos y Screening	8 días	510	--	--	Prader IV	8 días	6 y 8 meses
6	PS	Mujer	8,03	Screening	8 días	580	218	--	Prader IV	8 días	9 meses
7	PS	Varón	9,72	Screening	24 días	687	650	--	Normal	24 días	No
8	PS	Varón	3,01	Screening	8 días	363	311	--	Normal	8 días	No
9	PS	Varón	8,07	Screening	6 días	430	380	--	Hiperpigmentación	6 días	No
10	PS	Varón	3,58	Screening	8 días	730	370	--	Hiperpigmentación	8 días	No
11	PS	Varón	1,3	Screening	9 días	440	1130	--	Normal	9 días	No
12	PS	Varón	5,03	Screening	8 días	280	256	--	Hiperpigmentación	8 días	No
13	PS	Varón	16,25	Deshidratación	18 días	196	217	--	Hiperpigmentación	18 días	No
14	PS	Varón	14,6	Screening	12 días	77	71	--	Normal	12 días	No
15	PS	Varón	2,99	Screening	7 días	211	769	--	Hiperpigmentación	7 días	No
16	PS	Varón	17,37	Deshidratación	31 días	no	>200	--	Normal	31 días	No
17	PS	Varón	2,96	Screening	9 días	650	--	--	Hipospadias	9 días	No
18	PS	Varón	2,40	Deshidratación	47 días	500	590	--	Normal	47 días	No
19	PS	Varón	7,05	Screening	4 días	320	292	--	Normal	4 días	No
20	PS	Varón	3,8	Screening	10 días	420	--	--	Normal	10 días	No
21	PS	Varón	13,39	Screening	6 días	95	61	--	Hiperpigmentación	6 días	No
22	VS	Mujer	20,72	Hermana de	55 días	--	102	--	Prader II	55 días	19 meses



	Dx	Varón/ mujer	Edad estudio (años)	Modo de diagnóstico	Edad de Dx	17OHP (nmol/l)	17- OHP (ng/ml)	17-OHP (ng/ml) 60´	Virilización	Edad inicio tratamiento	Cirugía correctora (edad)
23	VS	Mujer	10,40	Screening	37 días	91	243	--	Prader III	37 días	11 meses
24	VS	Varón	4,78	Deshidratación	23 días	687	650	--	Normal	23 días	No
25	VS	Varón	3,11	Hermano de, prenatal.	Prenatal	363	311	--	Hiperpigmentación	45 días	No
26	VS	Varón	3,2	Screening	12 días	430	25	--	Normal	3 meses	No
27	VS	Varón	5,09	Screening	24 días	730	370	--	Normal	24 días	No
28	VS	Varón	3,58	Screening	12 dias	440	1130	--	Normal	13 meses	No
29	VS	Varón	10,6	Screening	18 días	280	256	--	Hiperpigmentación	23 días	No
30	NC	Mujer	10,24	Pubarquia prematura	8,60 años	--	5,3	11	Prader I	no	No
31	NC	Mujer	9,06	Pubarquia prematura	7,08 años	--	30	--	Prader I	8 años	No
32	NC	Mujer	10,12	Hermana de	3,44 años	--	3,1	29	Prader I	No	No
33	NC	Mujer	10,7	Pubarquia prematura	8,67 años	--	6,1	24	Prader I	8,67 años	No
34	NC	Mujer	11,79	Pubarquia prematura	7,80 años	--	13,7	59,4	Prader I	9,13 años	No
35	NC	Mujer	9,34	Pubarquia prematura	8,27 años	--	21	>50	Prader I	8,27 años	No
36	NC	Mujer	10,21	Pubarquia prematura	6,14 años	--	9,7	32	Prader I	6,14 años	No
37	NC	Mujer	8,42	Pubarquia prematura	6,26 años	--	24,9	>50	Prader I	6,26 años	No
38	NC	Mujer	9,52	Pubarquia prematura	6,91 años	--	1,4	56,6	Prader I	8 años	No
39	NC	Mujer	9,54	Hermana de	7,97 años	--	4,2	48	Prader I	9 años	No
40	NC	Varón	12,67	Hermano de	10,9 años	--	10,7	--	Normal	12 años	No
41	NC	Varón	3,79	Screening	8 días	86	39,8	--	Normal	7 meses	No
42	C	Mujer	9,03	Screening	45 días	127	98	--	Prader I	No	No
43	C	Varón	8,91	Screening	34 días	35	59	--	Normal	No	No

Tabla 30. Datos en el momento del estudio

	Dx	Varón/ mujer	Edad (años)	Tanner	17 OHP	cortisol	ACTH	aldosterona	ARP	DHEAS	testosterona	HC (mg/m2)	9αFludro (mg/día)	Otros	TA	Virilizaci ón
1	PS	Mujer	12,19	I	0,1	<1	23	<50	0,2	<15	<0,1	16,6	0,1	no	109/45	no
2	PS	Mujer	4,19	I	0,2	<1	103	<50	<0,2	<15	<0,1	14,2	0,075	no	79/59	no
3	PS	Mujer	26,03	V	0,6	<1	459	<50	0,2	<15	0,4	25	0,15	no	110/70	no
4	PS	Mujer	19,9	V	56	5	1187	<60	0,8	<30	1,3	10	0,05	no	120/68	F-G9, IM
5	PS	Mujer	7,10	I	<0,1	1,55	12,5	<50	1,1	<30	0,1	20	0,075	no	103/71	no
6	PS	Mujer	8,03	I	<0,1	1,5	54	<50	1,3	<15	0,1	20	0,075	no	120/84	no
7	PS	Varón	9,72	I	0,6	<1	101	<60	2,2	<30	0,1	20	0,125	no	105/56	no
8	PS	Varón	3,01	I	0,1	<1	265	<50	<0,1	<15	<0,1	14,5	0,125	no	130/68	no
9	PS	Varón	8,07	I	3,4	<1	26,6	<50	0,6	<15	0,2	15	0,075	no	86/42	no
10	PS	Varón	3,58	I	0,1	<1	69,26	<50	<0,2	<15	0,1	20	0,075	no	125/65	no
11	PS	Varón	1,3	I	0,4	<1	43,5	<50	0,3	<15	0,1	19	0,1	no	116/66	no
12	PS	Varón	5,03	I	50	2,8	106	<50	2,9	<15	<0,1	13,5	0,1	no	104/65	no
13	PS	Varón	16,25	V	92	2,8	71	244	5,7	42,4	5,8	10	0,1	LT4	136/66	no
14	PS	Varón	14,6	III	79	2,6	51	258	1,7	19	0,6	18,7	0,025	no	96/45	no
15	PS	Varón	2,99	I	1,4	<1	30,9	<50	2	<30	0,3	14,5	0,125	no	116/90	no
16	PS	Varón	17,37	V	1,3	<1	6	<60	2	<30	0,6	20	0,1	PxITU	101/64	no
17	PS	Varón	2,96	I	<0,1	<1	34	<50	<0,2	<30	<0,1	15,6	0,1	no	126/82	no
18	PS	Varón	2,40	I	<0,1	<1	42	<50	<0,2	<30	<1	15	0,1	no	148/72	no
19	PS	Varón	7,05	I	49	<1	122	<50	0,6	<15	0,2	9,3	0,0375	no	83/56	no
20	PS	Varón	3,8	I	1,2	<1	45	<50	1,7	<15	0,2	13,8	0,075	no	119/64	no
21	PS	Varón	13,39	III	191	3,1	271	185	6,4	16	4,6	22	0,125	no	101/61	no
22	VS	Mujer	20,72	V	29,7	1,8	22,5	111	<0,2	18,3	0,8	26	0,025	no	90/52	no
23	VS	Mujer	10,40	IV	2,9	<1	80	<50	0,2	<15	<0,1	20	0,05	no	101/66	no
24	VS	Varón	4,78	I	93	2,3	53,8	<50	4	<15	0,2	16	0,025	no	89/68	no

	Dx	Varón/ mujer	Edad (años)	Tanner	17 OHP	cortisol	ACTH	aldosterona	ARP	DHEAS	testosterona	HC (mg/m2)	9αFludro (mg/día)	Otros	TA	Virilizaci ón
25	VS	Varón	3,11	I	106	4,9	29	292	16	<15	0,4	12	0,05	no	91/61	no
26	VS	Varón	3,2	I	236	6,4	206	499	12,2	<30	0,1	10	no	no	91/58	no
27	VS	Varón	5,09	I	20	2,5	30,6	300	7,1	<15	0,3	7,5	no	no	90/54	no
28	VS	Varón	3,58	I	524	3,2	82	242	2,3	<15	0,4	16	no	no	88/52	no
29	VS	Varón	10,6	II	90	1	49	302	3,7	48	4	14	0,0625	no	121/60	no
30	NC	Mujer	10,24	III	41	15,9	42	365	1,3	--	0,7	8,2	no	no	97/55	no
31	NC	Mujer	9,06	II	14	12,2	48	192	1,8	--	0,6	15	no	no	108/50	no
32	NC	Mujer	10,12	I	3,7	2,63	26,8	<50	0,4	<15	2,2	13	no	no	87/68	no
33	NC	Mujer	10,7	II	3,7	19,3	29	91	1,2	--	2,2	15	no	no	115/65	no
34	NC	Mujer	11,79	IV	12,5	10,3	47	83,8	1,1	115	0,8	no	no	LT4	109/63	no
36	NC	Mujer	9,34	V	21	8	51	315	--	151	0,4	12,8	no	no	107/67	no
37	NC	Mujer	10,21	II-III	19,8	7,4	49	81	<0,2	183	1	15	no	no	108/62	no
38	NC	Mujer	8,42	III	6,2	13,9	34	57	0,8	28,5	0,5	12,5	no	no	114/62	no
39	NC	Mujer	9,52	II	3,8	6,3	31,7	92	0,5	67	0,4	8	no	no	102/56	no
40	NC	Mujer	9,54	II	20	9,2	62	154	3,2	125	0,6	8	no	AA	106/62	F-G7
43	NC	Varón	12,67	III	8,7	13	44	237	--	--	2,2	no	no	no	98/56	no
44	NC	Varón	3,79	IV	21	8	92	286	1,1	--	0,1	8	no	LT4	94/56	no
45	C	Mujer	9,03	II	3,1	18	77	69	0,8	<15	0,6	no	no	no	99/65	no
46	C	Varón	8,91	I	3,8	9,7	22,3	211	2,8		0,2	no	no	no	112/57	no

AA: antiandrógenos.

IM: irregularidades menstruales

PxITU: profilaxis infección de orina

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Gwynne JT, Strauss JF 3rd. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev* 1982;3:299-329.
2. Kovanen PT, Basu SK, Goldstein JL, Brown MS. Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. II. Low density lipoprotein binding to membranes prepared from fresh tissue. *Endocrinology* 1979;104(3):610-6.
3. Shima S, Mitsunaga M, Nakao T. Effect of ACTH on cholesterol dynamics in rat adrenal tissue. *Endocrinology* 1972;90(3):808-14.
4. Fraser R. Biosynthesis of adrenocortical steroids. In: VHT J, editor. *The Adrenal Gland*. New York: Raven Press; 1992. p. 191-207.
5. Rodriguez-Agudo D, Ren S, Wong E, Marques D, Redford K, Gil G, et al. Intracellular cholesterol transporter StarD4 binds free cholesterol and increases cholesteryl ester formation. *J Lipid Res* 2008;49(7):1409-19.
6. Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 1996;17(3):221-44.
7. Miller WL. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771(6):663-76.
8. Fujieda K, Okuhara K, Abe S, Tajima T, Mukai T, Nakae J. Molecular pathogenesis of lipid adrenal hyperplasia and adrenal hypoplasia congenita. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85(2-5):483-9.
9. Liu J, Heikkilä P, Meng QH, Kahri AI, Tikkanen MJ, Voutilainen R. Expression of low and high density lipoprotein receptor genes in human adrenals. *Eur J Endocrinol* 2000;142(6):677-82.
10. Azhar S, Reaven E. scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002;195:1-26.
11. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 1988;9(3):295-318.
12. Arlt W, Stewart PM. Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005;34(2):293-313.
13. Kim YC, Ariyoshi N, Artemenko I, Elliott ME, Bhattacharyya KK, Jefcoate CR. Control of cholesterol access to cytochrome P450scc in rat adrenal cells mediated by regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Steroids* 1997;62(1):10-20.

14. Arukwe A. Steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol side-chain cleavage (P450<sub>scc</sub>)-regulated steroidogenesis as an organ-specific molecular and cellular target for endocrine disrupting chemicals in fish. *Cell Biol Toxicol* 2008;24(6):527-40.
15. Hall PF. Cytochrome P-450 C21<sub>scc</sub>: one enzyme with two actions: hydroxylase and lyase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40(4-6):527-32.
16. Akhtar MK, Kelly SL, Kaderbhai MA. Cytochrome b(5) modulation of 17 $\alpha$  hydroxylase and 17-20 lyase (CYP17) activities in steroidogenesis. *J Endocrinol* 2005;187(2):267-74.
17. Labrie F, Simard J, Luu-The V, Pelletier G, Belghmi K, Bélanger A. Structure, regulation and role of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase enzymes in the formation of sex steroids in classical and peripheral intracrine tissues. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1994;8(2):451-74.
18. Sauer LA, Chapman JC, Dauchy RT. Topology of 3 beta-hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in adrenal cortex mitochondria and microsomes. *Endocrinology* 1994;134(2):751-9.
19. Rhéaume E, Lachance Y, Zhao HF, Breton N, Dumont M, de Launoit Y, et al. Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol* 1991;5(8):1147-57.
20. White PC, Chaplin DD, Weis JH, Dupont B, New MI, Seidman JG. Two steroid 21-hydroxylase genes are located in the murine S region. *Nature* 1984;312(5993):465-7.
21. White PC, New MI, Dupont B. Cloning and expression of cDNA encoding a bovine adrenal cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(7):1986-90.
22. Okamoto M, Nonaka Y, Takemori H, Doi J. Molecular identity and gene expression of aldosterone synthase cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(1):325-30.
23. Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Toda K, Yokoyama Y, Miyahara K, Miura S, et al. Role of steroid 11 beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(4):1458-62.

24. Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, et al. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 1991;5(10):1513-22.
25. John ME, John MC, Boggaram V, Simpson ER, Waterman MR. Transcriptional regulation of steroid hydroxylase genes by corticotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(13):4715-9.
26. Miller WL. Structure of genes encoding steroidogenic enzymes. *J Steroid Biochem* 1987;27(4-6):759-66.
27. Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC. Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J Biol Chem* 1989;264(35):20961-7.
28. Müller J, Oertle M. Separate induction of the two isozymes of cytochrome P-450(11) beta in rat adrenal zona glomerulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;47(1-6):213-21.
29. White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes. *Endocr Rev* 1994;15(4):421-38.
30. López-Calderón A, Martín AI, Soto L. Glucocorticoides. Andrógenos adrenales. In: Moreno B, editor. *Tratado de endocrinología básica y clínica*. Madrid; 2000. p. 978-1002.
31. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol*. 2001;22(3):185-212.
32. Goldman AS, Yakovac WC, Bongiovanni AM. Development of activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human fetal tissues and in two anencephalic newborns. *J Clin Endocrinol Metab* 1966;26(1):14-22.
33. Siiteri PK, MacDonald PC. Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1966;26(7):751-61.
34. James VH, Few JD. Adrenocorticosteroids: chemistry, synthesis and disturbances in disease. *Clin Endocrinol Metab* 1985;14(4):867-92.
35. Martín AI, Millán S, López-Calderón A. Estructura y función de la corteza suprarrenal. Mineralcorticoides. In: Tresguerres JAF, Aguilar E, Devesa J, Moreno B, editors. *Tratado de endocrinología básica y clínica*. Madrid; 2000. p. 951-76.
36. Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Cross-talk between adrenal medulla and adrenal cortex in stress. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:112-7.

37. Cozza EN, Gomez-Sanchez CE. Mechanisms of ET-1 potentiation of angiotensin-II stimulation of aldosterone production. *Am J Physiol* 1993;265:E179–E 83.
38. Hadley ME. *Endocrinology*. 1999;Sect. 192-9.
39. Lahera V, Navarro-Cid-J, De las Heras. Sistema renina-angiotensina. In: Tresguerres JAF, Aguilar E, Devesa J, Moreno B, editors. *Tratado de Endocrinología Básica y Clínica*. Madrid; 2000. p. 1367-84.
40. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1977;57(2):313-70.
41. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 1990;70(4):1067-116.
42. Yagci A, Oertle M, Seiler H, Schmid D, Campofranco C, Müller J. Potassium induces multiple steroidogenic enzymes in cultured rat zona glomerulosa cells. *Endocrinology* 1996;137(6):2406-14.
43. Simpson ER, Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol* 1988;50:427-40.
44. Lopez-Calderon A, Martín AI, Tresguerres JAF. Estructura y función de la corteza suprarrenal. In: Dieguez C, Yturriaga R, editors. *Glándulas suprarrenales*. Madrid: McGraw-Hill. Interamericana; 2008. p. 1-33.
45. Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:965-73.
46. Al-Mefty O, Teixeira A. Complex tumors of the glomus jugulare: criteria, treatment, and outcome. *J Neurosurg* 2002;97(6):1356-66.
47. Lekanidi K, Koumellis P, Bungay P, Birchall JD. An organ of Zuckerkandl tumour shown by MRA. *Eur Radiol* 2008;18(3):639-42.
48. Heth J. The basic science of glomus jugulare tumors. *Neurosurg Focus* 2004;17(2):E2.
49. Brown MJ, Alison DJ. Renal conversion of plasma DOPA to urine dopamine. *Br J Clin Pharmacol* 1981;12:251-3.
50. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev* 2004;56(3):331-49.



51. Xu L, Chen X, Sun B, Sterling C, Tank AW. Evidence for regulation of tyrosine hydroxylase mRNA translation by stress in rat adrenal medulla. *Brain Res* 2007;1158:1-10.
52. Ziegler MG, Bao X, Kennedy BP, Joyner A, Enns R. Location, development, control, and function of extraadrenal phenylethanolamine N-methyltransferase. *Ann N Y Acad Sci* 2002;971:76-82.
53. Bohn MC, Goldstein M, Black IB. Expression and development of phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) in rat brain stem: studies with glucocorticoids. *Dev Biol* 1986;114:180-93.
54. Kennedy B, Ziegler MG. Ontogeny of epinephrine metabolic pathways in the rat: role of glucocorticoids. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:53-9.
55. Tai TC, Claycomb R, Her S, Bloom AK, Wong DL. Glucocorticoid responsiveness of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *Mol Pharmacol* 2002;61:1385-92.
56. Wurtman RJ, Axelrod J. Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J Biol Chem* 1966;241(10):2301-5.
57. Wong DL. Why is the adrenal adrenergic? *Endocr Pathol* 2003;14(1):25-36.
58. Wong DL, Tai TC, Wong-Faull DC, Claycomb R, Kvetnanský R. Adrenergic responses to stress: transcriptional and post-transcriptional changes. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:249-56.
59. Kvetnansky R, Kubovcakova L, Tillinger A, Micutkova L, Krizanova O, Sabban EL. Gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in corticotropin-releasing hormone knockout mice during stress exposure. *Cell Mol Neurobiol* 2006;26(4-6):735-54.
60. Huber K, Combs S, Ernsberger U, Kalcheim C, Unsicker K. Generation of neuroendocrine chromaffin cells from sympathoadrenal progenitors: beyond the glucocorticoid hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;971:554-9.
61. Evinger MJ, Ernsberger P, Regunathan S, Joh TH, Reis DJ. A single transmitter regulates gene expression through two separate mechanisms: cholinergic regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA via nicotinic and muscarinic pathways. *J Neurosci.* 1994;14(4):2106-16.
62. Lee JC, Hook V. Proteolytic Fragments of Chromogranins A and B Represent Major Soluble Components of Chromaffin Granules, Illustrated by Two-Dimensional

Proteomics with NH(2)-Terminal Edman Peptide Sequencing and MALDI-TOF MS. *Biochemistry* 2009;[Epub ahead of print].

63. Sager G, Bratlid H, Little C. Binding of catecholamines to alpha-1 acid glycoprotein, albumin and lipoproteins in human serum. *Biochem Pharmacol*. 1987;36(21):3607-12.

64. Lopez-Calderon A, Calderón MD, Tresguerres JAF. Médula suprarrenal. In: Pombo M, Audí L, Bueno M, Calzada R, Cassorla F, Dieguez C, et al., editors. *Tratado de endocrinología pediátrica*. Madrid; 2009. p. 694-702.

65. Hinojosa-Laborde C, Lange DL. Endothelin regulation of adrenal function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26(12):995-9.

66. Takekoshi K, Motooka M, Isobe K, Nomura F, Manmoku T I, shii K, et al. Leptin directly stimulates catecholamine secretion and synthesis in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261(2):426-31.

67. Amiel S. Glucose counter-regulation in health and disease: current concepts in hypoglycaemia recognition and response. *Q J Med* 1991;80(293):707-27.

68. Wong DL. Epinephrine biosynthesis: hormonal and neural control during stress. *Cell Mol Neurobiol* 2006;26(4-6):891-900.

69. Sharman DF. Catabolism of the catecholamines. *Br Med Bull* 1973;29:110-5.

70. Duncan RJ, Sourkes TL. Some enzymic aspects of the production of oxidized or reduced metabolites of catecholamines and 5-hydroxytryptamine by brain tissues. *J Neurochem* 1974;22:663-9.

71. Kawamura M, Eisenhofer G, Kopin IJ, Kador P, Lee YS, Fujisawa S, et al. Aldose reductase: an aldehyde scavenging enzyme in the intraneuronal metabolism of norepinephrine in human sympathetic ganglia. *Auton Neurosci* 2002;96:131-9.

72. Eisenhofer G, Rudnqvist B, Aneman A. Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal metabolism to metanephrines. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3009-17.

73. Kopin IJ. Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev* 1985;37:333-63.

74. Peaston RT, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem* 2004;41(Pt 1):17-38.

75. Lee MR. Dopamine and the kidney: ten years on. *Clin Sci* 1993;84:357-75.

76. Pohorecky LA, Wurtman RJ. Adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Pharmacol Rev* 1971;23(1):1-35.
77. Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 1984;224(4648):452-9.
78. Wurtman RJ, Axelrod J. Adrenaline synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science* 1965;150(702):1464-5.
79. Bornstein SR, Tian H, Haidan A, Böttner A, Hiroi N, Eisenhofer G, et al. Deletion of tyrosine hydroxylase gene reveals functional interdependence of adrenocortical and chromaffin cell system in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(26):14742-7.
80. Fossom LH, Sterling CR, Tank AW. Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate and tyrosine hydroxylase mRNA stability by cyclic AMP and glucocorticoid. *Mol Pharmacol* 1992;42(5):898-908.
81. McMahon A, Sabban EL. Regulation of expression of dopamine beta hydroxylase in PC12 cells by glucocorticoids and cyclic AMP analogues. *J Neurochem* 1992;59:2040-7.
82. Jeong KH, Jacobson L, Pacák K, Widmaier EP, Goldstein DS, Majzoub JA. Impaired basal and restraint-induced epinephrine secretion in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *Endocrinology* 2000;141:1142-50.
83. Yoshida-Hiroi M, Bradbury MJ, Eisenhofer G, Hiroi N, Vale WW, Novotny GE, et al. Chromaffin cell function and structure is impaired in corticotropin-releasing hormone receptor type 1-null mice. *Mol Psychiatry* 2002;7:967-74.
84. Anderson DJ. Cell and molecular biology of neural crest cell lineage diversification. *Curr Opin Neurobiol* 1993;3:8-13.
85. Brown JW, Fishman LM, Carballeira A. Studies of the neuronal transdifferentiation process in cultured human pheochromocytoma cells: effects of steroids with differing functional groups on catecholamine content and cell morphology. *Steroids* 1998;63(11):587-94.
86. Davis KT, Prentice N, Gay VL, Murray SA. Gap junction proteins and cell-cell communication in the three functional zones of the adrenal gland. *J Endocrinol* 2002;173(1):13-21.
87. Anderson DJ, Carnahan JF, Michelsohn A, Patterson PH. Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells in vivo and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation

in the sympathoadrenal lineage. *J Neurosci.* 1991;11:3507–19.

88. Liu PS, Lin MK, Hsieh HL. Dehydroepiandrosterone sulfate inhibition of catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett* 1996;204(3):181-4.

89. Dar DE, Zinder O. Short term effect of steroids on catecholamine secretion from bovine adrenal medulla chromaffin cells. *Neuropharmacology* 1997;36(11-12):1783-8.

90. Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Vardouli L, Tsatsanis C, Stournaras C, Margioris AN, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. *Endocrinology* 2005;146:3309–18.

91. Ziegler CG, Sicard F, Latke P, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Krug AW. Dehydroepiandrosterone induces a neuroendocrine phenotype in nerve growth factor-stimulated chromaffin pheochromocytoma PC12 cells. *Endocrinology* 2008;149(1):320-8.

92. Sicard F, Ehrhart-Bornstein M, Corbeil D, Sperber S, Krug AW, Ziegler CG, et al. Growth factors, DHEA and DHEAS regulate chromaffin cells proliferation in an age-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2007–12.

93. Suzuki M, Wright LS, Marwah P, Lardy HA, Svendsen CN. Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3202–7.

94. Karishma KK, Herbert J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur J Neurosci* 2002;16:445–53.

95. Weise M, Eisenhofer G, Merke DP. Pubertal and gender-related changes in the sympathoadrenal system in healthy children. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(11):5038-43.

96. Goto J, Otsuka F, Yamashita M, Suzuki J, Otani H, Takahashi H, et al. Enhancement of aldosterone-induced catecholamine production by bone morphogenetic protein-4 through activating Rho and SAPK/JNK pathway in adrenomedullar cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:904-16.

97. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland. *Microsc Res Tech* 1997;36(6):520-33.
98. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 1998;19(2):101-43.
99. Bunday RA, Toneff T, Pottenger J, Kennedy BP, Ziegler MG, Hook VY. Agonist-stimulated neuropeptide and catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002;971:338-40.
100. Ehrhart-Bornstein M, Haidan A, Alesci S, Bornstein SR. Neurotransmitters and neuropeptides in the differential regulation of steroidogenesis in adrenocortical-chromaffin co-cultures. *Endocr Res* 2000;26:833-42.
101. Haidan A, Bornstein SR, Glasow A, Uhlmann K, Lübke C, Ehrhart-Bornstein M. Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells. *Endocrinology* 1998;139(2):772-80.
102. Mokuda O, Sakamoto Y, Kawagoe R, Ubukata E, Shimizu N. Epinephrine augments cortisol secretion from isolated perfused adrenal glands of guinea pigs. *Am J Physiol* 1992;262(6 Pt 1):E806-9.
103. Vizi ES, Tóth IE, Szalay KS, Windisch K, Orsó E, Szabó D, et al. Catecholamines released from local adrenergic axon terminals are possibly involved in fine tuning of steroid secretion from zona glomerulosa cells: functional and morphological evidence. *J Endocrinol* 1992;135(3):551-61.
104. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. *Z Rheumatol* 2000;59 Suppl 2:II/12-7.
105. Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Trzeciak WH, Usadel H, Güse-Behling H, Waterman MR, et al. Adrenaline stimulates cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 mRNA accumulation in bovine adrenocortical cells. *J Endocrinol* 1991;131:R5–R8.
106. Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Güse-Behling H, Stromeyer H, Scherbaum WA, Adler G, et al. Sympathoadrenal regulation of adrenal androstenedione release. *Neuroendocrinology* 1994;59:406–12.
107. Jones CT, Edwards AV. Release of adrenocorticotrophin from the adrenal gland in the conscious calf. *J Physiol (Lond)* 1990;426:397–407.

108. Güse-Behling H, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Waterman MR, Scherbaum WA, Adler G. Regulation of adrenal steroidogenesis by adrenaline: expression of cytochrome P450 genes. *J Endocrinol* 1992;135:229–37.
109. Ottenweller JE, Meier AH. Adrenal innervation may be an extrapituitary mechanism able to regulate adrenocortical rhythmicity in rats. *Endocrinology* 1982;111:1334–8.
110. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF, Holst JJ. Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology* 1990;127:900-6.
111. Dijkstra I, Binnekade R, Tilders FJH. Diurnal variation in resting levels of corticosterone is not mediated by variation in adrenal responsiveness to adrenocorticotropin but involves splanchnic nerve integrity. *Endocrinology* 1996;137:540–7.
112. Muglia LJ, Jacobson L, Weninger SC, Luedeke CE, Bae DS, Jeong KH, et al. Impaired diurnal adrenal rhythmicity restored by constant infusion of corticotropin-releasing hormone in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *J Clin Invest* 1997;99:2923–9.
113. Edwards AV, Jones CT, Bloom SR. Reduced adrenal cortical sensitivity to ACTH in lambs with cut splanchnic nerves. *J Endocrinol* 1986;110:81–5.
114. Dallman MF, Engeland WC, McBride MH. The neural regulation of compensatory adrenal growth. *Ann NY Acad Sci* 1977;297:373–92.
115. Charlton BG. Adrenal cortical innervation and glucocorticoid secretion. *J Endocrinol* 1990;126(1):5-8.
116. Gupta P, Franco-Saenz R, Mulrow PJ. Regulation of the adrenal renin angiotensin system in cultured bovine zona glomerulosa cells: effect of catecholamines. *Endocrinology* 1992;130(4):2129-34.
117. Horiuchi T, Tanaka K, Shimizu N. Effect of catecholamine on aldosterone release in isolated rat glomerulosa cell suspensions. *Life Sci* 1987;40(25):2421-8.
118. Nussdorfer GG. Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. *Pharmacol Rev* 1996;48(4):495-530.
119. Lightly ER, Walker SW, Bird IM, Williams BC. Subclassification of beta-adrenoceptors responsible for steroidogenesis in primary cultures of bovine adrenocortical zona fasciculata/reticularis cells. *Br J Pharmacol.* 1990;99(4):709-12.

120. Walker SW, Lightly ERT, Clyne C, Williams BC, Bird IM. Adrenergic and cholinergic regulation of cortisol secretion from zona fasciculata/reticularis of bovine adrenal cortex. *Endocr Res* 1991;17:237–65.
121. Lotshaw DP, Franco-Saenz R, Mulrow PJ. Guanabenz-induced inhibition of aldosterone secretion from isolated rat adrenal glomerulosa cells. *Am J Med Sci* 1991;301(1):15-20.
122. Jiang X, Wang J, Luo T, Li Q. Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its feedback regulation in serotonin transporter knockout mice. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34(3):317-31.
123. Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Hamel C, Delarue C, Thuillez C, et al. Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal gland. *Endocr Res* 1996;22:851–3.
124. Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H, et al. Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(10):5001-7.
125. Winter JS, Gow KW, Perry YS, Greenberg AH. A stimulatory effect of interleukin-1 on adrenocortical cortisol secretion mediated by prostaglandins. *Endocrinology* 1990;127:1904–9.
126. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981;213(4514):1394-7.
127. Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(10):6517-21.
128. De Souza E, Van Loon GR. Corticotropin releasing factor increases the adrenocortical responsiveness to adrenocorticotropin. *Experientia* 1984;40:1004–6.
129. Jones CT, AV E. The role of corticotrophin releasing factor in relation to the neural control of adrenal function in conscious calves. *J Physiol (Lond)* 1992;447:489–500.
130. van Oers JWAM, Hinson JP, Binnekade R, Tilders FJH. Physiological role of corticotropin-releasing factor in the control of adrenocorticotropin-mediated corticosterone release from the rat adrenal gland. *Endocrinology* 1992;130:282–8.

131. Bornstein SR, Ehrhart M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF. Adrenocortical atrophy of hypophysectomized rats can be reduced by corticotropin releasing hormone (CRH). *Cell Tissue Res* 1990;260:161–6.
132. Bruhn TO, Engeland WC, Anthony ELP, Gann DS, Jackson IMD. Corticotropin-releasing factor in the dog adrenal medulla is secreted in response to hemorrhage. *Endocrinology* 1987;120:25–33.
133. Bruhn TO E, ngeland WC, Anthony EL, Gann DS, Jackson IM. Corticotropin-releasing factor in the adrenal medulla. *Ann N Y Acad Sci* 1987;512:115-28.
134. Pomerantz JE, Li C, Nathanielsz PW, McDonald TJ. Corticotropin-releasing hormone-like axons in the adrenal glands of fetal and postnatal sheep. *J Auton Nerv Syst* 1996;59:87–9.
135. Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H, Shizume K. Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:861–6.
136. Oers JW, Tilders FJ. Non-adrenocorticotropin mediated effects of endogenous corticotropin-releasing factor on the adrenocortical activity in the rat. *J Neuroendocrinol* 1991;3(2):119-21.
137. Suda T, Tomori N, Yajima F, Odagiri E, Demura H, Shizume K. Characterization of immunoreactive corticotropin and corticotropin-releasing factor in human adrenal and ovarian tumors. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986;111:546–52.
138. Venihaki M, Gravanis A, Margioris AN. Comparative study between normal rat chromaffin and PC12 rat pheochromocytoma cells: production and effects of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1997;138:698–704.
139. Yorimitsu M, Okada S, Yamaguchi-Shima N, Shimizu T, Arai J, Yokotani K. Role of brain adrenoceptors in the corticotropin-releasing factor-induced central activation of sympatho-adrenomedullary outflow in rats. *Life Sci* 2008;82(9-10):487-94.
140. Udelsman R, Harwood JP, Millan MA, Chrousos GP, Goldstein DS, Zimlichman R, et al. Functional corticotropin releasing factor receptors in the primate peripheral sympathetic nervous system. *Nature* 1986;319:147–50.
141. Aguilera G, Millan MA, Hauger RL, Catt KJ. Corticotropinreleasing factor receptors: distribution and regulation in brain, pituitary, and peripheral tissues. *Ann NY Acad Sci* 1987;512:48–66.



142. Andreis PG, Neri G, Nussdorfer GG. Corticotropin-releasing hormone (CRH) directly stimulates corticosterone secretion by the rat adrenal gland. *Endocrinology* 1991;128:1198–200.
143. Li CH, Chung D, Yamashiro D, Lee CY. Isolation, characterization, and synthesis of a corticotropin-inhibiting peptide from human pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75(9):4306-9.
144. Andreis PG, Neri G, Mazzocchi G, Musajo FG, Nussdorfer GG. Direct secretagogue effect of corticotropin-releasing factor on the rat adrenal cortex: the involvement of the zona medullaris. *Endocrinology* 1992;131:69–72.
145. Bagdy G, Calogero AE, Szemeredi K, Chrousos GP, Gold PW. Effects of cortisol treatment on brain and adrenal corticotropin-releasing hormone (CRH) content and other parameters regulated by CRH. *Regul Pept* 1990;31(2):83-92.
146. Fehm HL, Holl R, Späth-Schwalbe E, Born J, Voigt KH. Ability of corticotropin releasing hormone to stimulate cortisol secretion independent from pituitary adrenocorticotropin. *Life Sci* 1988;42(6):679-86.
147. Edwards AV, Jones CT. Adrenal responses to the peptide PACAP in conscious functionally hypophysectomized calves. *Am J Physiol* 1994;266(6 Pt 1):E870-6.
148. Andreis PG, Malendowicz LK, Belloni AS, Nussdorfer GG. Effects of pituitary adenylate-cyclase activating peptide (PACAP) on the rat adrenal secretory activity: preliminary in-vitro studies. *Life Sci* 1995;56(2):135-42.
149. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Neri G, Andreis PG, Ziolkowska A, Gottardo L, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PACAP receptor expression and function in the rat adrenal gland. *Int J Mol Med* 2002;9(3):233-43.
150. Jagger PI. Adrenocortical response to critical illness: the renin-aldosterone axis. In: Ober KP, editor. *Contemporary Endocrinology: Endocrinology of critical disease*. Totowa, NJ: Humana Press; 1997. p. 137-54.
151. González-Hernández JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Geschwend JE, Adler G, Scherbaum WA. Macrophages within the human adrenal gland. *Cell Tissue Res* 1994;278(2):201-5.
152. Feige JJ, Baird A. Growth factor regulation of adrenal cortex growth and function. *Prog Growth Factor Res* 1991;3(2):103-13.

153. Spinazzi R, Andreis PG, Nussdorfer GG. Neuropeptide-Y and Y-receptors in the autocrine-paracrine regulation of adrenal gland under physiological and pathophysiological conditions. *Int J Mol Med* 2005;15(1):3-13.
154. Ulrich-Lai YM, Engeland WC. Adrenal splanchnic innervation modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats. *Neuroendocrinology* 2002;76:79-92.
155. Ulrich-Lai YM, Arnhold MM, Engeland WC. Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290(4):R1128-35.
156. Hinson JP, Vinson GP, Kapas S, Teja R. The relationship between adrenal vascular events and steroid secretion: the role of mast cells and endothelin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40:381-9.
157. Rosolowsky LJ, Campbell WB. Endothelin enhances adrenocorticotropin-stimulated aldosterone release from cultured bovine adrenal cells. *Endocrinology* 1990;126:1860-6.
158. Andreis PG, Neri G, Prayer-Galetti T, Rossi GP, Gottardo G, Malendowicz LK, et al. Effects of adrenomedullin on the human adrenal glands: an in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1167-70.
159. Cameron LA, Hinson JP. The role of nitric oxide derived from L-arginine in the control of steroidogenesis, and perfusion medium flow rate in the isolated perfused rat adrenal gland. *J Endocrinol* 1993;139:415-23.
160. Fortak W, Kmiec B. About occurrence of the chromophilic cells in the adrenal cortex of white rats. *Endokrynol Pol* 1968;19:117-28.
161. Kmiec B. Histologic and histochemical observations on regeneration of the adrenal medulla after enucleation in white rats. *Folia Morphol* 1968;27:238-45.
162. Palacios G, Lafraga M. Chromaffin cells in the glomerular zone of adult rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res* 1975;164:275-8.
163. Gallo-Payet N, Pothier P, Isler H. On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex: their possible role in adrenocortical function. *Biochem Cell Biol* 1987;65:588-92.
164. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Usadel H, Boëckmann M, Scherbaum WA. Morphological evidence for a close interaction

of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. *Cell Tissue Res* 1991;265:1–9.

165. Bornstein SR, González-Hernández JA, Ehrhart-Bornstein M, Adler G, Scherbaum WA. Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:223–25.

166. Berka JL, Kelly DJ, Robinson DB, Alcorn D, Marley PD, Fernley RT, et al. Adrenaline cells of the rat adrenal cortex and medulla contain renin and prorenin. *Mol Cell Endocrinol* 1996;119:175–84.

167. Kanno Y, Loewenstein WR. Cell-to-cell passage of large molecules. *Nature* 1966;212(5062):629-30.

168. Martin PE, Evans WH. Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovasc Res* 2004;62(2):378-87.

169. Murray SA, Nickel BM, Gay VL. Gap junctions as modulators of adrenal cortical cell proliferation and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2009;300:51-6.

170. Usadel H, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Kreysch HG, Scherbaum WA. Gap junctions in the adrenal cortex. *Horm Metab Res* 1993;25:653–4.

171. Huang GY, Cooper ES, Waldo K, Kirby ML, Gilula NB, Lo CW. Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *J Cell Biol* 1998;143(6):1725-34.

172. Degen J, Meier C, Van Der Giessen RS, Söhl G, Petrasch-Parwez E, Urschel S, et al. Expression pattern of lacZ reporter gene representing connexin36 in transgenic mice. *J Comp Neurol* 2004;473(4):511-25.

173. McDonald TJ, Li C, Massmann GA, Figueroa JP. Connexin 43 ontogeny in fetal sheep adrenal glands. *Steroids* 2003;68(7-8):613-20.

174. Colomer C, Olivos Ore LA, Couty N, Mathieu MN, Arthaud S, Fontanaud P, et al. Functional remodeling of gap junction-mediated electrical communication between adrenal chromaffin cells in stressed rats. *J Neurosci.* 2008;28(26):6616-26.

175. Vinson GP, Hinson JP, Toth IE. The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol* 1994;6:235–46.

176. Parker TL, Kesse WK, Mohamed AA, Afework M. The innervation of the mammalian adrenal gland. *J Anat* 1993;183:265–76.

177. Dorovini-Zis K, Zis AP. Innervation of the zona fasciculata of the human adrenal cortex: a light and electron microscopic study. *J Neural Transm* 1991;84:75–84.
178. Bloom SR, Edwards AV, Jones CT. The adrenal contribution to the neuroendocrine responses to splanchnic nerve stimulation in conscious calves. *J Physiol (Lond)* 1988;397:513–26.
179. Gaumann DM, Yaksh TL, Tyce GM, Stoddard SL. Adrenal vein catecholamines and neuropeptides during splanchnic nerve stimulation in cats. *Peptides* 1989;10:587–92.
180. Hinson JP, Vinson GP. Calcitonin gene-related peptide stimulates adrenocortical function in the isolated perfused rat adrenal gland in situ. *Neuropeptides* 1990;16:129–33.
181. Hinson JP, Cameron LA, Purbrick A, Kapas S. The role of neuropeptides in the regulation of adrenal vascular tone: effects of vasoactive intestinal polypeptide, substance P, neuropeptide Y, neurotensin, Met-enkephalin, and Leu-enkephalin on perfusion medium flow rate in the intact perfused rat adrenal. *Regul Pept* 1994;51:55–61.
182. Nichols J, Richardson AW. Effect of DDD on steroid response and blood flow through the adrenal after ACTH. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960;104:539–42.
183. Wright RD. Blood flow through the adrenal gland. *Endocrinology* 1963;72:418–28.
184. Hinson JP, Vinson GP, Pudney J, Whitehouse BJ. Adrenal mast cells modulate vascular and secretory responses in the intact adrenal gland of the rat. *J Endocrinol* 1989;121:253–60.
185. Hinson JP, Vinson GP, Kapas S, TejaR. The role of endothelin in the control of adrenocortical function: stimulation of endothelin release by ACTH and the effects of endothelin-1 and endothelin-3 on steroidogenesis in rat and human adrenocortical cells. *J Endocrinol* 1991;128:275–80.
186. Naito Y, Fukata J, Tamai S, Seo N, Nakai Y, Mori K, et al. Biphasic changes in hypothalamo-pituitary-adrenal function during the early recovery period after major abdominal surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73(1):111-7.
187. Elenkov IJ, Webster EL, Torpy DJ, hrousos GP. Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Ann N Y Acad Sci* 1999;876:1-11.

188. Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77(6):1690-4.
189. Soni A, Pepper GM, Wyrwinski PM, Ramirez NE, Simon R, Pina T, et al. Adrenal insufficiency occurring during septic shock: incidence, outcome, and relationship to peripheral cytokine levels. *Am J Med Sci* 1995;98(3):266-71.
190. Gold PW, Chrousos G, Kellner C, Post R, Roy A, Augerinos P, et al. Psychiatric implications of basic and clinical studies with corticotropin-releasing factor. *Am J Psychiatry* 1984;141(5):619-27.
191. Wang ZQ, Siragy HM, Felder RA, Carey RM. Intrarenal dopamine production and distribution in the rat. Physiological control of sodium excretion. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):228-34.
192. Brown RD, Wisgerhof M, Carpenter PC, Brown G, Jiang NS, Kao P, et al. Adrenal sensitivity to angiotensin II and undiscovered aldosterone stimulating factors in hypertension. *J Steroid Biochem* 1979;11(1C):1043-50.
193. Pärth G, Scherbaum WA, Bornstein SR. The role of interleukin-6 in the human adrenal gland. *Eur J Clin Invest* 2000;30 Suppl 3:91-5.
194. Marx C, Bornstein SR, Wolkersdörfer GW, Peter M, Sippell WG, Scherbaum WA. Relevance of major histocompatibility complex class II expression as a hallmark for the cellular differentiation in the human adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(9):3136-40.
195. Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 2009;89(2):535-606.
196. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 1992;267(9):1244-52.
197. Tai TC, Claycomb R, Siddall BJ, Bell RA, Kvetnansky R, Wong DL. Stress-induced changes in epinephrine expression in the adrenal medulla in vivo. *J Neurochem* 2007;101(4):1108-18.
198. Kubovcakova L, Tybitanclova K, Sabban EL, Majzoub J, Zorad S, Vietor I, et al. Catecholamine synthesizing enzymes and their modulation by immobilization stress in knockout mice. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1018:458-65.
199. Kvetnanský R, Krizanová O, Tillinger A, Sabban EL, Thomas SA, Kubovcakova L. Regulation of gene expression of catecholamine biosynthetic

- enzymes in dopamine-beta-hydroxylase- and CRH-knockout mice exposed to stress. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:257-68.
200. Edwards AV, Jones CT. Autonomic control of adrenal function. *J Anat* 1993;183:291-307.
  201. Engeland WC, Gann DS. Splanchnic nerve stimulation modulates steroid secretion in hypophysectomized dogs. *Neuroendocrinology* 1989;50:124-31.
  202. Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24(3):151-80.
  203. Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 2005;146(6):2544-50.
  204. Pandey AV, Flück CE, Huang N, Tajima T, Fujieda K, Miller WL. P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis affecting all microsomal P450 enzymes. *Endocr Res* 2004;30(4):881-8.
  205. Scott RR, Miller WL. Genetic and clinical features of p450 oxidoreductase deficiency. *Horm Res* 2008;69(5):266-75.
  206. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 1988;81(6):866-74.
  207. Trakakis E, Basios G, Trompoukis P, Labos G, Grammatikakis I, Kassanos D. An update to 21-hydroxylase deficient congenital adrenal hyperplasia. *Gynecol Endocrinol* 2009:1-9.
  208. Cutfield WS, Webster D. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand. *J Pediatr* 1995;126(1):118-21.
  209. Pang S, Murphey W, Levine LS, Spence DA, Leon A, LaFranchi S, et al. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55(3):413-20.
  210. Balsamo A, Cacciari E, Piazzzi S, Cassio A, Bozza D, Pirazzoli P, et al. Congenital adrenal hyperplasia: neonatal mass screening compared with clinical diagnosis only in the Emilia-Romagna region of Italy, 1980-1995. *Pediatrics* 1996;98:362-7.

211. Cartigny-Maciejewski M, Guilley N, Vanderbecken S, Gondé S, Stuckens C, Ponté C, et al. Neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Lille experience 1980-1996. *Arch Pediatr* 1999;6(2):151-8.
212. Therrell BL Jr, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, et al. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 1998;101:583-90.
213. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1985;37:650-67.
214. Sherman SL, Aston CE, Morton NE, Speiser PW, New MI. A segregation and linkage study of classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1988;42:830-8.
215. Wilson RC, Nimkarn S, Dunic M, Obeid J, Azar MR, Najmabadi H, et al. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2007;90:414-21.
216. Kuttann F, Couillin P, Girard F, Billaud L, Vincens M, Boucekkine C, et al. Late-onset adrenal hyperplasia in hirsutism. *N Engl J Med* 1985;313(4):224-31.
217. Escobar-Morreale HF, Sanchón R, San Millán JL. A prospective study of the prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(2):527-33.
218. Ezquieta B, Ruano MLF, Dulin E, Rodríguez Arnao MD, Rodríguez A. Estimación de la prevalencia de enfermedades recesivas frecuentes en población española mediante análisis de ADN en muestras del cribado neonatal. *Med Clin (Barc)* 2005;125:493-5.
219. Dulin E, Cortes E, Chamorro F, Eguileor I, Espada M, Pámpols T, et al. Estado actual de los programas de cribado neonatal en España. *Med Clin (Barc)* 2001;59:467-78.
220. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod Update* 2004;10(6):469-85.
221. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003;349(8):776-88.

222. Rodriguez MD, Rodriguez A, Badillo K, Velasco A, Dulin E, Ezquieta B. Deficit de 21-hidroxilasa: aspectos actuales. *Endocr Nutr* 2006;53(2):124-36.
223. Holmes-Walker DJ, Conway GS, Honour JW, Rumsby G, Jacobs HS. Menstrual disturbance and hypersecretion of progesterone in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;43(3):291-6.
224. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews* 2000;21:245-91.
225. Cabrera M, Vogiatzi MGG, New MI. Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:3070-8.
226. Cutfield RG, Bateman JM, Odell WD. Infertility caused by bilateral testicular masses secondary to congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Fertil Steril*. 1983;40(6):809-14.
227. Combes-Moukhovsky ME, Kottler ML, Valensi P, Boudou P, Sibony M, Attali JR. Gonadal and adrenal catheterization during adrenal suppression and gonadal stimulation in a patient with bilateral testicular tumors and congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79(5):1390-4.
228. New MI, Gertner JM, Speiser PW, del Balzo P. Growth and final height in classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr Jpn* 1988;30:79-88.
229. Bonaccorsi AC, Adler I, Figueiredo JG. Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients. *Fertil Steril*. 1987;47(4):664-70.
230. Blumberg-Tick J, Boudou P, Nahoul K, Schaison G. Testicular tumors in congenital adrenal hyperplasia: steroid measurements from adrenal and spermatic veins. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73(5):1129-33.
231. White PC, Speiser PW. Long-term consequences of childhood-onset congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16(2):273-88.
232. DiMartino-Nardi J, Stoner E, O'Connell A, New MI. The effect of treatment of final height in classical congenital adrenal hyperplasia (CAH). *Acta Endocrinol Suppl* 1986;279:305-14.



233. Premawardhana LD, Hughes IA, Read GF, Scanlon MF. Longer term outcome in females with congenital adrenal hyperplasia (CAH): the Cardiff experience. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46(3):327-32.
234. Hargitai G, Sólyom J, Battelino T, Lebl J, Pribilincová Z, Hauspie R, et al. Growth patterns and final height in congenital adrenal hyperplasia due to classical 21-hydroxylase deficiency. Results of a multicenter study. *Horm Res* 2001;55(4):161-71.
235. Cabrera MS, Vogiatzi MG, New MI. Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(7):3070-8.
236. Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30(1):31-59.
237. Lin-Su K, Nimkarn S, New MI. Congenital adrenal hyperplasia in adolescents: diagnosis and management. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1135:95-8.
238. Speiser PW. Nonclassic adrenal hyperplasia. *Rev Endocr Metab Disord* 2009;10(1):77-82.
239. New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(11):4205-14.
240. Carmina E, Rosato F, Janni A, Rizzo M, Longo RA. Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(1):2-6.
241. Kamel N, Tonyukuk V, Emral R, Corapçıoglu D, Bastemir M, Güllü S. The prevalence of late onset congenital adrenal hyperplasia in hirsute women from Central Anatolia. *Endocr J* 2003;50(6):815-23.
242. Lajic' S, Clauin S, Robins T, Vexiau P, Blanché H, Bellanne-Chantelot C, et al. Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2824-9.
243. Dolzan V, Prezelj J, Vidan-Jeras B, Breskvar K. Adrenal 21-hydroxylase gene mutations in Slovenian hyperandrogenic women: evaluation of corticotrophin stimulation and HLA polymorphisms in screening for carrier status. *Eur J Endocrinol*. 1999;141(2):132-9.
244. Admoni O, Israel S, Lavi I, Gur M, Tenenbaum-Rakover Y. Hyperandrogenism in carriers of CYP21 mutations: the role of genotype. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64(6):645-51.

245. Ezquieta B, Oyarzabal M, Barrio R, Luzuriaga C, Hermoso F, Lechuga JL, et al. Monogenic and polygenic models detected in steroid 21-hydroxylase deficiency-related paediatric hyperandrogenism. *Horm Res* 2009;71(1):28-37.
246. Janzen N, Peter M, Sander S, Steuerwald U, Terhardt M, Holtkamp U, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(7):2581-9.
247. Van der Kamp HJ, Oudshoorn CG, Elvers BH, van Baarle M, Otten BJ, Wit JM, et al. Cutoff levels of 17-alpha-hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(7):3904-7.
248. Azziz R, Zacur HA. 21-Hydroxylase deficiency in female hyperandrogenism: screening and diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69(3):577-84.
249. Dewailly D, Vantyghem-Haudiquet MC, Sainsard C, Buvat J, Cappoen JP, Ardaens K, et al. Clinical and biological phenotypes in late-onset 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63(2):418-23.
250. Azziz R, Dewailly D, Owerbach D. Nonclassic adrenal hyperplasia: Current concepts. *J End Clin Metab* 1994;78, 4:810- 5.
251. Grosse SD, Vliet GV. How many deaths can be prevented by newborn screening for congenital adrenal hyperplasia? *Horm Res* 2007;67:284-91.
252. Honour JW, Torresani T. Evaluation of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2001;55(4):206-11.
253. Brosnan CA, Brosnan PG, Swint JM. Analyzing the cost of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 2001;107(5):1238.
254. Brosnan CA, Brosnan PG. Methodological issues in newborn screening evaluation with special reference to congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13(9):1555-62.
255. Brosnan PG, Brosnan CA, Kemp SF, Domek DB J, elley DH, Blackett PR, et al. Effect of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999;153(12):1272-8.
256. Thilén A, Larsson A. Congenital adrenal hyperplasia in Sweden 1969-1986. Prevalence, symptoms and age at diagnosis. *Acta Paediatr Scand* 1990;79(2):168-75.
257. Kovács J, Votava F, Heinze G, Sólyom J, Lebl J, Pribilincová Z, et al. Lessons from 30 years of clinical diagnosis and treatment of congenital adrenal

hyperplasia in five middle European countries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(7):2958-64.

258. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(14):5111-5.

259. Gomes LG, Huang N, Agrawal V, Mendonça BB, Bachega TA, Miller WL. Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: effect on 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(1):89-95.

260. White PC, Vitek A, Dupont B, New MI. Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(12):4436-40.

261. Urabe K, Kimura A, Harada F, Iwanaga T, Sasazuki T. Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet.* 1990;46(6):1178-86.

262. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992;90(2):584-95.

263. Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet* 1995;96(2):198-204.

264. Ezquieta B, Cueva E, Oyarzábal M, Oliver A, Varela JM, Jariego C. Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. *Clin Genet* 2002;62(2):181-8.

265. Ezquieta B. Hiperplasia suprarrenal congénita. Correlación genotipo/fenotipo. *An Esp Pediatr* 2006;64:77-64.

266. Ezquieta B, Cueva E, Varela CJM, C J. Aportaciones del análisis molecular en la hiperplasia suprarrenal congénita. *Acta Pediatr* 2001;59:479-96.

267. Linder BL, Esteban NV, Yergey AL, Winterer JC, Loriaux DL, Cassorla F. Cortisol production rate in childhood and adolescence. *J Pediatr* 1990;117(6):892-6.

268. Nieman LK. Treatment of classic congenital adrenal hyperplasia due to CYP21A2 (21-hydroxylase) deficiency in adults. *UpToDate* 2008.

269. Riepe FG, Sippell WG. Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8(4):349-63.

270. Yeste D, Gussinyé M, Clemente M, Albisu M, Audi L, Carrascosa A. Tratamiento y seguimiento del déficit de 21-hidroxilasa en niños. *Revista de hormona y factores de crecimiento* 2009;20-30.
271. Merke DP. Approach to the adult with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(3):653-60.
272. Christiansen P, Mølgaard C, Müller J. Normal bone mineral content in young adults with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res* 2004;61(3):133-6.
273. Oliver A, Ezquieta B, Gussinyé M. Hiperplasia suprarrenal congenita. In: Argente J, Carrascosa A, Gracia R, Rodríguez Hierro, editors. *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia*. Barcelona: Doyma; 2000. p. 995-1042.
274. Laue L, Merke DP, Jones JV, Barnes KM, Hill S, Cutler GB Jr. A preliminary study of flutamide, testolactone, and reduced hydrocortisone dose in the treatment of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(10):3535-9.
275. Merke DP, Keil MF, Jones JV, Fields J, Hill S, Cutler GB Jr. Flutamide, testolactone, and reduced hydrocortisone dose maintain normal growth velocity and bone maturation despite elevated androgen levels in children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(3):1114-20.
276. Quintos JB, Vogiatzi MG, Harbison MD, New MI. Growth hormone therapy alone or in combination with gonadotropin-releasing hormone analog therapy to improve the height deficit in children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(4):1511-7.
277. Lin-Su K, Vogiatzi MG, Marshall I, Harbison MD, Macapagal MC, Betensky B, et al. Treatment with growth hormone and luteinizing hormone releasing hormone analog improves final adult height in children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(6):3318-25.
278. Van Wyk JJ, Gunther DF, Ritzén EM, Wedell A, Cutler GB Jr, Migeon CJ, et al. The use of adrenalectomy as a treatment for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(9):3180-90.
279. Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 2009;300:192-6.

280. Forest MG, Morel Y, David M. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol Metab* 1998;9(7):284-9.
281. New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, Cabrera MS, Goseco A, et al. Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(12):5651-7.
282. New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall J, Calera MS, Goseco A ea. Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *J Endocrinol Metab* 2001;86:5651-7.
283. Wurtman RJ, Reisine TD. Adrenocortical control of epinephrine synthesis in health and disease. *Adv Metab Disord* 1971;5:53-76.
284. Bornstein SR, Tajima T, Eisenhofer G, Haidan A, Aguilera G. Adrenomedullary function is severely impaired in 21-hydroxylase-deficient mice. *FASEB J*. 1999;13(10):1185-94.
285. Charmandari E, Eisenhofer G, Mehlinger SL, Carlson A, Wesley R, Keil MF, et al. Adrenomedullary function may predict phenotype and genotype in classic 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(7):3031-7.
286. Merke DP, Chrousos GP, Eisenhofer G, Weise M, Keil MF, Rogol AD, et al. Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patients with classic 21-hydroxylase deficiency. *N Engl J Med* 2000;343(19):1362-8.
287. Weise M, Mehlinger SL, Drinkard B, Rawson E, Charmandari E, Hiroi M, et al. Patients with classic congenital adrenal hyperplasia have decreased epinephrine reserve and defective glucose elevation in response to high-intensity exercise. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):591-7.
288. Weise M, Drinkard B, Mehlinger SL, Holzer SM, Eisenhofer G, Charmandari E, et al. Stress dose of hydrocortisone is not beneficial in patients with classic congenital adrenal hyperplasia undergoing short-term, high-intensity exercise. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(8):3679-84.
289. Merke DP, Camacho CA. Novel Basic and Clinical Aspects of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2001;2:289-96.
290. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49:411-7.

291. Merke DP, Bornstein SR, Avila NA, Crousos GP. Future Directions in the Study and Management of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Ann Intern Med* 2002;136:320-34.
292. Delgado Beltrán P, Melchor Marcos JC, Rodríguez-Alarcón Gómez J, Linares Uribe A, Fernández-Llebrez del Rey L, Barbazán Cortés MJ, et al. The fetal development curves of newborn infants in the Hospital de Cruces (Vizcaya). I. Weight. *An Esp Pediatr* 1996;44(1):50-4.
293. Delgado Beltrán P, Melchor Marcos JC, Rodríguez-Alarcón Gómez J, Linares Uribe A, Fernández-Llebrez del Rey L, Barbazán Cortés MJ, et al. The fetal development curves of newborn infants in the Hospital de Cruces (Vizcaya). II. Length, head circumference and ponderal index. *An Esp Pediatr* 1996;44(1):55-9.
294. Prader A, Gurtner HP. The syndrome of male pseudohermaphrodisism in congenital adrenocortical hyperplasia without overproduction of androgens (adrenal male pseudohermaphrodisism). *Helv Paediatr Acta* 1955;10(4):397-412.
295. Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, et al. Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem* 1991;109(4):638-44.
296. Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, Stengler B, Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(5):1145-52.
297. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(3):1059-65.
298. Swerdlow AJ, Higgins CD, Brook CG, Dunger DB, Hindmarsh PC, Price DA, et al. Mortality in patients with congenital adrenal hyperplasia: a cohort study. *J Pediatr* 1998;133(4):516-20.
299. Hinde FR, Johnston DI. Hypoglycaemia during illness in children with congenital adrenal hyperplasia. *Br Med J* 1984;289(6458):1603-4.
300. Sobradillo B, Aguirre A, Aresti U, Bilbao A, Fernández-Ramos C, Lizárraga A, et al. Curvas y Tablas de Crecimiento. Estudios longitudinal y transversal. Bilbao: Fundación Faustino Orbegojo; 2004.

301. Tanner JM. Growth at adolescence. Oxford: Blackwell; 1962.
302. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. Arch Dis Child 1969;44:291-303.
303. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. Arch Dis Child 1970;45:13-23.
304. Greulich WW, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2.<sup>a</sup>ed. ed. Stanford: Stanford University Press; 1959.
305. Bayley N, Pinneau S. Tables for predicting adult height from skeletal age. J. Pediatr. 1952;14:423-41.
306. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. J Clin Endocrinol Metab 1961;21:1440-7.
307. Grupo Cooperativo Español para el Estudio de los Factores de Riesgo Cardiovascular en la Infancia y Adolescencia. Factores de riesgo cardiovascular en la infancia y adolescencia en España. Estudio RICARDIN I: objetivos, diseño y resultados del estudio piloto. An Esp Pediatr 1995;43:5-10.
308. Grupo Cooperativo Español para el Estudio de los Factores de Riesgo Cardiovascular en la Infancia y Adolescencia. Factores de riesgo cardiovascular en la infancia y adolescencia en España. Estudio RICARDIN II: valores de referencia. An Esp Pediatr 1995;43:11-7.
309. Adolescents NHBPEPWGoHBPICa. The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. Pediatrics 2004;114:555-76.
310. Crawford JD, Terry ME, Rourke GM. Simplification of drug dosage calculation by application of the surface area principle. Pediatrics 1950;5(5):783-90.
311. Boomsma F, Alberts G, van Eijk L, Man in't Veld AJ, Schalekamp MA. Optimal collection and storage conditions for catecholamine measurements in human plasma and urine. Clin Chem 1993;39:2503-8.
312. Giles HG, Meggiorini S. Stability of catecholamines in urine. Clin Chem 1985; 29:595.
313. McCreanor G, Patel D, Wright D. The effect of acid concentration on the stability of urinary free catecholamines. In: Martin SM, Halloran SP, editors. Proceedings of the ACB National Meeting. London: The Association of Clinical Biochemists; 1993. p. 74.

314. Winkobe C. Measurement of catecholamines and their metabolites in urine. *J Clin Pathol* 1991;44:269-75.
315. Fitzgibbon MC, Tormey WP. Paediatric reference ranges for urinary catecholamines/metabolites and their relevance in neuroblastoma diagnosis. *Ann Clin Biochem* 1994;31 ( Pt 1):1-11.
316. Ezquieta B, Jariego C, Varela CJM, Oliver A, Gracia R. Microsatellite typing in the indirect analysis of the steroid 21-hydroxylase gene. *Pren Diag* 1997;17(429-34).
317. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Ultrastructural evidence for a paracrine regulation of the rat adrenal cortex mediated by the local release of catecholamines from chromaffin cells. *Endocrinology* 1992;131(6):3126-8.
318. Engeland WC. Functional innervation of the adrenal cortex by the splanchnic nerve. *Horm Metab Res* 1998;30:311-4.
319. Haase M, Ansurudeen I, Schinner S, Paramonova I, Schott M, Papewalis C, et al. Evidence for the involvement of endothelial cell products in adrenal CITED2 expression. *Cell Tissue Res* 2009;Epub ahead of print.
320. Charmandari E, Johnston A, Brook CG, Hindmarsh PC. Bioavailability of oral hydrocortisone in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Endocrinol* 2001;169(1):65-70.
321. Charmandari E, Matthews DR, Johnston A, Brook CG, Hindmarsh PC. Serum cortisol and 17-hydroxyprogesterone interrelation in classic 21-hydroxylase deficiency: is current replacement therapy satisfactory? *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(10):4679-85.
322. Charmandari E, Hindmarsh PC, Johnston A, Brook CG. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: alterations in cortisol pharmacokinetics at puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(6):2701-8.
323. Charmandari E, Brook CG, Hindmarsh PC. Why is management of patients with classical congenital adrenal hyperplasia more difficult at puberty? *Arch Dis Child* 2002;86(4):266-9.
324. Charmandari E, Brook CG, Hindmarsh PC. Classic congenital adrenal hyperplasia and puberty. *Eur J Endocrinol* 2004;151 Suppl 3:U77-82.
325. Finken MJ, Andrews RC, Andrew R, Walker BR. Cortisol metabolism in healthy young adults: sexual dimorphism in activities of



A-ring reductases, but not 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999;84:3316–21.

326. Andrew R, Phillips DI, Walker BR. Obesity and gender influence cortisol secretion and metabolism in man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998;83:1806–9.

327. Low SC, Assad SN, Rajan V, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. Regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase by sex steroids in vivo: further evidence for the existence of a second dehydrogenase in rat kidney. *Journal of Endocrinology* 1993;139:27–35.

328. Merola B, Rossi E, Colao A, Cataldi M, Longobardi S, Schettini G, et al. Effect of a short-term treatment with recombinant growth hormone (GH) on adrenal responsiveness to corticotrophin stimulation in children affected by isolated GH deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1992;74:1210–4.

329. Miller JD, Tannenbaum GS, Colle E, Guyda HJ. Daytime pulsatile growth hormone secretion during childhood and adolescence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1982; 55:989–94.

330. Blum WF, Albertson-Wikland K, Rosberg S, Ranke MB. Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein- 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993;76:1610–6.

331. Amiel SA, Sherwin RS, Simonson DC, AA I, Tamborlane WV. Impaired insulin action in puberty: a contributing factor to poor glycaemic control in adolescents with diabetes. *New England Journal of Medicine* 1986;315:215–9.

332. Kristiansen SB, Endoh A, Casson PR, Buster JE, Hornsby PJ. Induction of steroidogenic enzyme genes by insulin and IGF-I in cultured adult human adrenocortical cells. *Steroids* 1997;62:258–65.

333. Moghetti P, Castello R, Negri C, Tosi F, Spiazzi GG, Brun E, et al. Insulin infusion amplifies 17  $\alpha$ -hydroxycorticosteroid intermediates response to adrenocorticotropin in hyperandrogenic women: apparent relative impairment of 17,20-lyase activity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81:881–6.

334. Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, Brik C, Quintero N, Medina F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83:2001–5.
335. Palermo M, Shackleton CHL, Mantero F, Stewart PM. Urinary free cortisone and the assessment of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase activity in man. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 1996;45:605–11.
336. Charmandari E, Weise M, Bornstein SR, Eisenhofer G, Keil MF, Chrousos GP, et al. Children with classic congenital adrenal hyperplasia have elevated serum leptin concentrations and insulin resistance: potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(5):2114-20.
337. Bornstein SR, Chrousos GP. Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(5):1729-36.
338. Bornstein SR, Stratakis CA, Chrousos GP. Adrenocortical tumors: recent advances in basic concepts and clinical management. *Ann Intern Med* 1999;30(9):759-71.
339. Doupe AJ, Landis SC, Patterson PH. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J Neurosci* 1985;5(8):2119-42.
340. Tietze HU, Zurbrugg RP, Zuppinger KA, Joss EE, Käser H. Occurrence of impaired cortisol regulation in children with hypoglycemia associated with adrenal medullary hyporesponsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 1972;34(6):948-58.
341. Zuckerman-Levin N, Tiosano D, Eisenhofer G, Bornstein S, Hochberg Z. The importance of adrenocortical glucocorticoids for adrenomedullary and physiological response to stress: a study in isolated glucocorticoid deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(12):5920-4.
342. Hinde FR, Johnston DI. Hypoglycaemia during illness in children with congenital adrenal hyperplasia. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;289(6458):1603-4.
343. Donaldson MD, Thomas PH, Love JG, Murray GD, McNinch AW, Savage DC. Presentation, acute illness, and learning difficulties in salt wasting 21-hydroxylase deficiency. *Arch Dis Child* 1994;70(3):214-8.

344. Mackinnon J, Grant DB. Hypoglycaemia in congenital adrenal hyperplasia. *Arch Dis Child*. 1977;52(7):591-3.
345. Artavia-Loria E, Chaussain JL, Bougnères PF, Job JC. Frequency of hypoglycemia in children with adrenal insufficiency. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1986;279:275-8.
346. Winder WW, Yang HT, Jaussi AW, Hopkins CR. Epinephrine, glucose, and lactate infusion in exercising adrenomedullated rats. *J Appl Physiol* 1987;62(4):1442-7.
347. Yang HT, Hammer RL, Sellers TL, Arogyasami J, Carrell DT, Winder WW. Adrenomedullation affects endurance but not hepatic fructose 2,6-bisphosphate. *Am J Physiol* 1988;254(4 Pt 2):R572-7.
348. Rodrigues AG, Lima NR, Coimbra CC, Marubayashi U. Evidence that exercise-induced heat storage is dependent on adrenomedullary secretion. *Physiol Behav* 2008;94(3):463-7.
349. Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19(5):175-80.
350. Vermes I, Beishuizen A, Hampsink RM, Haanen C. Dissociation of plasma adrenocorticotropin and cortisol levels in critically ill patients: possible role of endothelin and atrial natriuretic hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(4):1238-42.
351. Marik PE. Critical illness-related corticosteroid insufficiency. *Chest* 2009;135(1):181-93.
352. Zelena D, Barna I, Csabai K, Orlando GF, Makara GB, Engelmann M. Response of the adrenomedullary system to early postnatal stress in the Brattleboro rat. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:456-61.
353. Coker RH, Kjaer M. Glucoregulation during exercise : the role of the neuroendocrine system. *Sports Med*. 2005;35(7):575-83.
354. Kjaer M. Hepatic glucose production during exercise. *Adv Exp Med Biol*. 1998;441:117-27.
355. Wortsman J. Role of epinephrine in acute stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2002;31(1):79-106.
356. McMorris T, Davranche K, Jones G, Hall B, Corbett J, Minter C. Acute incremental exercise, performance of a central executive task, and sympathoadrenal

- system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Int J Psychophysiol.* 2009;Epub ahead of print.
357. Hirsch IB, Marker JC, Smith LJ, Spina RJ, Parvin CA, Holloszy JO, et al. Insulin and glucagon in prevention of hypoglycemia during exercise in humans. *Am J Physiol* 1991;260:E695-704.
  358. Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 2000; 43:533–49.
  359. Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV, Hardie LJ. Rapid inhibition of ob gene expression and circulating leptin levels in lean mice by the beta 3-adrenoceptor agonists BRL 35135A and ZD2079. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;228:605–10.
  360. Rayner DV, Simon E, Duncan JS, Trayhurn P. Hyperleptinaemia in mice induced by administration of the tyrosine hydroxylase inhibitor alpha-methyl-tyrosine. *FEBS Lett* 1998;429:395–8.
  361. Riepe FG, Krone N, Krüger SN, Sweep FC, Lenders JW, Dötsch J, et al. Absence of exercise-induced leptin suppression associated with insufficient epinephrine reserve in patients with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;114(3):105-10.
  362. Saygili F, Oge A, Yilmaz C. Hyperinsulinemia and insulin insensitivity in women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: the relationship between serum leptin levels and chronic hyperinsulinemia. *Horm Res* 2005;63(6):270-4.
  363. Völkl TM, Simm D, Körner A, Rascher W, Kiess W, Kratzsch J, et al. Does an altered leptin axis play a role in obesity among children and adolescents with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency? *Eur J Endocrinol* 2009;160(2):239-47.
  364. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995;269:540–54.
  365. Tataranni PA, Cizza G, Snitker S, Gucciardo F, Lotsikas A, Chrousos GP, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system activities in Pima Indians and Caucasians. *Metabolism* 1999;48:395–9.

366. Fox C, Esparza J, Nicolson M, Bennett PH, Schulz LO, Valencia ME, et al. Plasma leptin concentrations in Pima Indians living in drastically different environments. *Diabetes Care* 1999;22:413–7.
367. Ukkola O, Pöykkö S, Päivänsalo M, Kesäniemi YA. Interactions between ghrelin, leptin and IGF-I affect metabolic syndrome and early atherosclerosis. *Ann Med* 2008;40(6):465-73.
368. Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, et al. Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 1998;139:4264–8.
369. Cherradi N, Capponi AM, Gaillard RC, Pralong FP. Decreased expression of steroidogenic acute regulatory protein: a novel mechanism participating in the leptin-induced inhibition of glucocorticoid biosynthesis. *Endocrinology* 2001;142:3302–8.
370. L'Allemand D, Penhoat A, Lebrethon MC, Ardevol R, Baehr V, Oelkers W, et al. Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab Clin North Am* 1996;81:3892–7.
371. Biason-Lauber A, Zachmann M, Schoenle EJ. Effect of leptin on CYP17 enzymatic activities in human adrenal cells: new insight in the onset of adrenarche. *Endocrinology* 2000;141:1446–54.
372. McMorris T, Swain J, Smith M, Corbett J, Delves S, Sale C, et al. Heat stress, plasma concentrations of adrenaline, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and cortisol, mood state and cognitive performance. *Int J Psychophysiol.* 2006;61(2):204-15.
373. van Zijderveld GA, van Doornen LJ, van Faassen I, Orlebeke JF, van Dyck R, Tilders FJ. Adrenaline and the relationship between neurosomatism, aerobic fitness and mental task performance. *Biol Psychol* 1993;36(3):157-81.
374. Prince J. Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *J Clin Psychopharmacol.* 2008;28(3 Suppl 2):S39-45.
375. Inozemtseva O, Matute E, Juárez J. Learning disabilities spectrum and sexual dimorphic abilities in girls with congenital adrenal hyperplasia. *J Child Neurol* 2008;23(8):862-9.

376. Bornstein SR, Breidert M, Ehrhart-Bornstein M, Kloos B, Scherbaum WA. Plasma catecholamines in patients with Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;42(2):215-8.
377. Eisenhofer G, Friberg P, Pacak K, Goldstein DS, Murphy DL, Tsigos C, et al. Plasma metadrenalines: do they provide useful information about sympatho-adrenal function and catecholamine metabolism? *Clin Sci* 1995;88(5):533-42.
378. Collett-Solberg PF. Congenital adrenal hyperplasia: from genetics and biochemistry to clinical practice, Part 1. *Clin Pediatr (Phila)* 2001;40(1):1-16.
379. Collett-Solberg PF. Congenital adrenal hyperplasia: from genetics and biochemistry to clinical practice, part 2. *Clin Pediatr (Phila)* 2001;40(3):125-32.
380. Speiser PW, Agdere L, Ueshiba H, White PC, New MI. Aldosterone synthesis in salt-wasting congenital adrenal hyperplasia with complete absence of adrenal 21-hydroxylase. *N Engl J Med* 1991;324(3):145-9.
381. Manoli I, Kanaka-Gantenbein Ch, Voutetakis A, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C. Early growth, pubertal development, body mass index and final height of patients with congenital adrenal hyperplasia: factors influencing the outcome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57(5):669-76.
382. Bonfig W, Bechtold S, Schmidt H, Knorr D, Schwarz HP. Reduced final height outcome in congenital adrenal hyperplasia under prednisone treatment: deceleration of growth velocity during puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(5):1635-9.
383. Trinh L, Nimkarn S, New MI, Lin-Su K. Growth and pubertal characteristics in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2007;20(8):883-91.
384. Muirhead S, Sellers E, HJ. G. Indicators of adult height outcome in classical 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Pediatrics* 2002;247-52.
385. Eugster EA, Dimeglio LA, Wright JC, Freidenberg GR, Seshadri R, Pescovitz OH. Height outcome in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency: a meta-analysis. *J Pediatr* 2001;138(1):26-32.
386. Frisch H, Waldhauser F, Lebl J, Solyom J, Hargitai G, Kovacs J, et al. Congenital adrenal hyperplasia: lessons from a multinational study. *Horm Res* 2002;57 Suppl 2:95-101.

387. Van der Kamp HJ, Otten BJ, Buitenweg N, De Muinck Keizer-Schrama SM, Oostdijk W, Jansen M, et al. Longitudinal analysis of growth and puberty in 21-hydroxylase deficiency patients. *Arch Dis Child* 2002;87(2):139-44.
388. Balsamo A, Cicognani A, Baldazzi L, Barbaro M, Baronio F, Gennari M, et al. CYP21 genotype, adult height, and pubertal development in 55 patients treated for 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(12):5680-8.
389. Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinos C, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fékété C, et al. Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(6):2624-33.
390. Young MC, Hughes IA. Response to treatment of congenital adrenal hyperplasia in infancy. *Arch Dis Child* 1990;65:441-4.
391. Brook CG. The management of classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990;33:559-67.
392. Appan S, Hindmarsch PC, Brook CG. Monitoring treatment in congenital adrenal hyperplasia. *Arch Dis Child* 1989;64:1235-9.
393. Charmandari E, Calis KA, Keil MF, Mohassel MR, Remaley A, Merke DP. Flutamide decreases cortisol clearance in patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(7):3197-200.
394. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005;365(9477):2125-36.
395. Clayton PE, Miller WL, Oberfield SE, Ritzen EM, Sippell WG, Speiser PW. Consensus Statement on 21-Hydroxylase Deficiency from The Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and The European Society for Pediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4048-53.
396. Baumgartner Parzer SM, Nowotny P, Heinze G, Waldausl W, Vierhapper H. Carrier Frequency of Congenital Adrenal Hyperplasia (21-Hydroxylase Deficiency) in a Middle European Population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:775-8.
397. Gunther DF, Bukowski TP, Ritzén EM, Wedell A, Van Wyk JJ. Prophylactic adrenalectomy of a three-year-old girl with congenital adrenal hyperplasia: pre- and postoperative studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(10):3324-7.
398. Van Wyk JJ, Ritzen EM. The role of bilateral adrenalectomy in the treatment of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(7):2993-8.

399. Ogilvie CM, Rumsby G, Kurzwinski T, Conway GS. Outcome of bilateral adrenalectomy in congenital adrenal hyperplasia: one unit's experience. *Eur J Endocrinol* 2006;154(3):405-8.
400. Warinner SA, Zimmerman D, Thompson GB, Grant CS. Study of three patients with congenital adrenal hyperplasia treated by bilateral adrenalectomy. *World J Surg* 2000;24(11):1347-52.
401. Meyers RL, Grua JR. Bilateral laparoscopic adrenalectomy: a new treatment for difficult cases of congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Surg* 2000;35(11):1586-90.
402. Jääskeläinen J, Levo A, Voutilainen R, Partanen J. Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: good correlation in a well defined population. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(10):3293-7.
403. Deneux C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, Charron D, et al. Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(1):207-13.
404. Hughes I. Congenital adrenal hyperplasia: phenotype and genotype. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15 Suppl 5:1329-40.
405. Dolzan V, Sólyom J, Fekete G, Kovács J, Rakosnikova V, Votava F, et al. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2005;153(1):99-106.
406. Carrera P, Bordone L, Azzani T, Brunelli V, Garancini MP, Chiumello G, et al. Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 1996;98(6):662-5.
407. Dardis A, Bergada I, Bergada C, Rivarola M, Belgorosky A. Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Endocrinol Metab* 1997;10(1):55-61.
408. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(12):4416-9.



409. Rumsby G, Avey CJ, Conway GS, Honour JW. Genotype-phenotype analysis in late onset 21-hydroxylase deficiency in comparison to the classical forms. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48(6):707-11.
410. Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem* 1990;265(34):20916-22.
411. Dracopoulou-Vabouli M, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C. The spectrum of molecular defects of the CYP21 gene in the Hellenic population: variable concordance between genotype and phenotype in the different forms of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(6):2845-8.
412. Baumgartner-Parzer SM, Schulze E, Waldhäusl W, Pauschenwein S, Rondot S, Nowotny P, et al. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Austria: identification of a novel missense mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(10):4771-5.
413. Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A, Lajic S, Robins T, Barp L, et al. Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. *J Mol Med* 2006;84(6):521-8.
414. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(8):2322-9.
415. Speiser PW, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia. *N Engl J Med* 2003;349:776-88.
416. Merke DP, Bornstein SR. Congenital Adrenal Hyperplasia. *Lancet* 2005;365:2125-36.
417. Ezquieta B, Cueva E, yarzbal M, Oliver A, Varela JM, Jariego C. Gene conversión and the founder effect contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population. *Clin Genet* 2002;62:181-8.
418. Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinou C, Lorat-Jacob S, Nihoul-Fékété C, et al. Follow-Up of 68 Children with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency: Relevance of Genotype for Management. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2624-33.
419. Stikkelbroeck NM, Hoefsloot LH, de Wijs IJ, Otten BJ, Hermus AR, Siskens EA. CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase

deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(8):3852-9.

420. Speiser PW, New MI. Genotype and hormonal phenotype in nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:86-91.

421. Winkel CA, Casey ML, Worley RJ, Madden JD, MacDonald PC. Extraadrenal steroid 21-hydroxylase activity in a woman with congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56(1):104-7.

422. Li YY, Inoue K, Takei Y. Interrenal steroid 21-hydroxylase in eels: primary structure, progesterone-specific activity and enhanced expression by ACTH. *J Mol Endocrinol* 2003;31(2):327-40.

423. Chemaitilly W, Betensky BP, Marshall I, Wei JQ, Wilson RC, New MI. The natural history and genotype-phenotype nonconcordance of HLA identical siblings with the same mutations of the 21-hydroxylase gene. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005;18(2):143-53.

424. Mellon SH, Miller WL. Extraadrenal steroid 21-hydroxylation is not mediated by P450c21. *J Clin Invest*. 1989;84(5):1497-502.

425. Zhou Z, Agarwal VR, Dixit N, White P, Speiser PW. Steroid 21-hydroxylase expression and activity in human lymphocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1997;127(1):11-8.

426. Horner JM, Hintz RL, Luetscher JA. The role of renin and angiotensin in salt-losing, 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;48(5):776-83.

427. Koppens PF, Hoogenboezem T, Drop SL, de Muinck-Keizer-Schrama SM, Degenhart HJ. Aldosterone production despite absence or defectiveness of the CYP21 genes in two patients with salt-losing congenital adrenal hyperplasia caused by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49(6):815-22.

428. Stoner E, Dimartino-Nardi J, Kuhnle U, Levine LS, Oberfield SE, New MI. Is salt-wasting in congenital adrenal hyperplasia due to the same gene as the fasciculata defect? *Clin Endocrinol (Oxf)* 1986;24(1):9-20.

429. Nimkarn S, Lin-Su K, Berglind N, Wilson RC, New MI. Aldosterone-to-renin ratio as a marker for disease severity in 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(1):137-42.

430. Eränkő O, Eränkő L. Morphological indications of SIF cell functions. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1977;16:525-31.
431. Doupe AJ, Patterson PH, Landis SC. Small intensely fluorescent cells in culture: role of glucocorticoids and growth factors in their development and interconversions with other neural crest derivatives. *J Neurosci*. 1985;5(8):2143-60.
432. Howlett K, Galbo H, Lorentsen J, Bergeron R, Zimmerman-Belsing T, Bülow J, et al. Effect of adrenaline on glucose kinetics during exercise in adrenalectomised humans. *J Physiol* 1999;519 Pt 3:911-21.
433. Cordes U, Keller H, Beyer J. Diagnostic value of plasma catecholamine determination in primary adrenal cortex insufficiency. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 1975;81:1540-4.
434. Eisenhofer G, Huynh TT, Hiroi M, Pacak K. Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma. *Rev Endocr Metab Disord* 2001;2(3):297-311.
435. GROUP JLECW. Consensus Statement on 21-Hydroxylase Deficiency from The Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and The European Society for Paediatric Endocrinology. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002;87(9):4048–53.
436. Clayton PE, Miller WL, Oberfield SE, Ritzén EM, Sippell WG, PW; S, et al. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the European Society for Paediatric Endocrinology and the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. *Horm Res* 2002;58(4):188-95.
437. Gotoh H, Kusakabe M, Shiroishi T, Moriwaki K. Survival of steroid 21-hydroxylase-deficient mice without endogenous corticosteroids after neonatal treatment and genetic rescue by transgenesis as a model system for treatment of congenital adrenal hyperplasia in humans. *Endocrinology* 1994;135(4):1470-6.
438. Tajima T, Okada T, Ma XM, Ramsey W, Bornstein S, Aguilera G. Restoration of adrenal steroidogenesis by adenovirus-mediated transfer of human cytochromeP450 21-hydroxylase into the adrenal gland of 21-hydroxylase-deficient mice. *Gene Ther* 1999;6(11):1898-903.